

**Нижегородский научно-исследовательский институт  
имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора**

**Генно-инженерные вакцины  
для профилактики инфекционных  
заболеваний**

**Новиков В.В., Цыганова М.И., Новиков Д.В., Мохорова Е.В.,  
Мелентьев Д.А., Лапин В.А., Зайцев Д.Е.**

**Монография**

Нижегород, 2025

УДК 579.61

ББК

В 60

Рецензенты:

Смирнов В.Ф., заведующий научно-исследовательской лабораторией микробиологического анализа отдела химико-биологических исследований НИИ химии, профессор кафедры биохимии и биотехнологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, докт. биол. наук, профессор;

Талаев В.Ю., ведущий научный сотрудник - заведующий лабораторией клеточной иммунологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, докт. биол. наук, профессор

Генно-инженерные вакцины для профилактики инфекционных заболеваний. Монография / Новиков В.В., Цыганова М.И., Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Мелентьев Д.А., Лапин В.А., Зайцев Д.Е. - Нижний Новгород: Изд-во «Дятловы горы», 323 с.

В монографии представлена информация о разрабатываемых вакцинах для профилактики кишечных инфекций и энтеровирусных инфекций, вызываемых такими группами инфекционных агентов как ротавирусы, норовирусы, энтеровирусы. Представлена информация о вакцинах для профилактики хеликобактерной инфекции, о гликонъюгированных антибактериальных вакцинах. Приводятся механизмы развития иммунологической памяти, описаны приемы усиления иммунного ответа с помощью адъювантов, рассмотрены вопросы, связанные с разработкой мукозальных вакцин, в том числе пероральных и интраназальных вакцин. Ставится акцент на используемой авторами технологической платформе, основанной на вирусоподобных частицах. Дается описание двух авторских разработок прототипов генно-инженерных вакцин, основанных на использовании химерных вирусоподобных частиц.

Монография предназначена для специалистов Роспотребнадзора, научных сотрудников, биотехнологов, врачей-эпидемиологов, врачей-бактериологов, преподавателей и студентов биомедицинских специальностей.

## Оглавление

|  |     |
|--|-----|
| Введение.....  | 3   |
| Виды вакцин.....                                       | 5   |
| Иммунологическая память.....                           | 25  |
| Адьюванты.....   | 37  |
| Вакцины на основе вирусоподобных частиц.....           | 85  |
| Мукозальные вакцины.....                               | 98  |
| Биоконъюгированные вакцины.....                        | 119 |
| Разработка вакцин против хеликобактерной инфекции..... | 195 |
| Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции.....         | 233 |
| Разработка норовирусных вакцин.....                    | 263 |
| Энтеровирусные вакцины.....                            | 281 |
| Прототип вакцины против норовирусной инфекции.....     | 302 |
| Прототип вакцины против вируса E30.....                | 312 |
| Заключение.....  | 322 |

## Введение

Вакцины — это биологические препараты, предназначенные для индукции безопасного иммунологического ответа, позволяющего защитить организм от болезней. Они используются для создания длительного защитного иммунитета, что является одним из наиболее важных инструментов поддержания медицинского благополучия настоящего и будущих поколений. В глобальном масштабе вакцины доказали свою эффективность в снижении смертности и заболеваемости, вызванной многими инфекциями. Вакцины ежегодно предотвращают во всем мире несколько миллионов смертей или тысячи смертей в день. Эффективность вакцины определяется входящими в ее состав антигенами, содержащими эпитопы для Т-клеточных рецепторов и протективных антител, которые позволяют реализовать эффективный иммунный ответ на повторное появление патогена в организме.

Традиционные подходы к разработке вакцин (живые аттенуированные или инактивированные вакцины) привели к созданию обширного перечня вакцин для профилактики заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. Однако для многих сложных патогенов, таких как вирусы с высокой антигенной изменчивостью или многие бактерии, традиционные подходы не дали возможности создать эффективные вакцины. Традиционные подходы не позволяют достаточно быстро реагировать на периодически возникающие вспышки новых вариантов патогенов. Кроме того, при получении традиционных вакцин необходимо крупномасштабное производство патогенов, что несет определенные риски по их попаданию в окружающую среду. Для преодоления этих ограничений необходима разработка стратегий получения надежных, безопасных и недорогих в производстве вакцин.

Благодаря недавним достижениям в области структурной биологии, молекулярной биологии и иммунологии направленное конструирование или дизайн вакцин стали очень активным направлением исследований. Дизайн вакцин, основанный на структуре антигенов, также известный как структурная

вакцинология, является подходом, в котором антигены конструируются с использованием доступной информации об их строении и свойствах. Такой способ позволяет разрабатывать новые вакцины против традиционно сложных мишеней. Методы структурной вакцинологии дают возможность получать упрощенные антигены, содержащие только четко определенные эпитопы для индукции специфических нейтрализующих антител. Кроме того, методология, позволяет получать антигены, слитые химически или генетическими способами с белками, усиливающими иммунный ответ на них. Такая модификация структуры антигена направлена на стабилизацию его конформации, оптимизацию презентации эпитопа, повышение иммуногенности, повышение стабильности при транспортировке и хранении.

Быстрый технологический прогресс, особенно в связи с глобальным воздействием COVID-19, привел к значительным достижениям в области вакцин. В данной монографии представлена информация о существующих и разрабатываемых генно-инженерных вакцинах, в основном касающихся энтеровирусных и кишечных инфекций. Кроме того, будут представлены авторские разработки по созданию прототипов вакцин для профилактики норовирусной и энтеровирусной инфекций, выполненные в последние пять лет.

Монография предназначена для научных работников, занимающихся вакцинологией и вакцинопрофилактикой, эпидемиологов, врачей-инфекционистов, студентов медицинских и биологических специальностей, а также специалистов разных профилей, интересующихся достижениями в области создания новых вакцин.

## Виды вакцин

Традиционные подходы к разработке вакцин опираются на две основные стратегии. Первая заключается в использовании целого патогена, то есть живого патогена в ослабленном состоянии (атеннуированные вакцины) или убитого (инактивированного) патогена [1, 2]. Во второй стратегии в качестве антигена применяют отдельные компоненты патогена, из которых с использованием различных методологий получают субъединичные вакцины, токсоидные вакцины, вакцины на основе вирусоподобных частиц, пептидно-конъюгированные субъединичные вакцины, вакцины на основе нуклеиновых кислот и векторные вакцины (таблица 1).

Инактивированные или убитые вакцины не содержат живых патогенов. Такие вакцины состоят из микроорганизмов, не способных к репликации, которые либо убиты, либо инактивированы различными методами, такими как термическая инактивация, химическая инактивация или облучение, при сохранении структурной целостности поверхностных антигенных эпитопов [3, 6, 7]. Убитые вакцины в основном индуцируют системные гуморальные реакции, приводящие к продукции нейтрализующих антител.

Эти вакцины можно вводить людям с ослабленным иммунитетом, потому что мертвые патогены не могут вернуться в жизнеспособное состояние. Однако неадекватная инактивация может оставить патоген живым, а чрезмерная инактивация может нарушить антигенные эпитопы. Наличие дополнительных избыточных поверхностных антигенных участков может вызывать тяжелые аллергические реакции [3]. Обычно инактивированные вакцины обеспечивают менее длительную защиту по сравнению с живыми вакцинами. Примеры инактивированных вакцин против вирусных инфекций - инъекционная форма вакцины против полиомиелита, вакцина против бешенства, вакцина против гепатита А и вакцина для профилактики гриппа.

Таблица 1 – Перечень стратегий, используемых при разработке вакцин

| Вид вакцины   | Основа вакцины   |
|---|--|
| Инактивированные или убитые вакцины                 | Патогены, не способные размножаться (вакцины против бешенства, полиомиелита, гепатита А, гриппа и др).   |
| Живые аттенуированные вакцины                       | Ослабленные патогены, со сниженной вирулентностью (вакцины против кори, свинки, краснухи, оспы, желтой лихорадки и др).  |
| Субъединичные вакцины                               | Очищенные фрагменты патогенов  |
| Вакцины на основе конъюгатов белков и полисахаридов | Бактериальные полисахариды, конъюгированные с белком носителем (вакцины против гемофильной инфекции, вызванной <i>Haemophilus influenzae</i> (палочка Пфайфера) и пневмококковой инфекции) |
| Токсоидные вакцины (на основе анатоксинов)          | Инактивированные микробные экзотоксины (вакцины против коклюша, столбняка, дифтерии).  |
| Вакцины на основе вирусоподобных частиц (ВпЧ)       | Вирусные белки, образующие структуры, повторяющие вирион, и не содержащие генетический материал (вакцина против вируса папилломы человека).  |
| Вакцины на основе нуклеиновых кислот                | ДНК или мРНК кодирующие белки патогена (вакцина против Sars-Cov-2)   |
| Векторные вакцины                                   | Кодирующий антиген генетический материал, упакованный в неопасный вирус или бактерию (вакцина против Sars-Cov-2)   |

Живые аттенуированные (ослабленные) вакцины вызывают сильные иммунологические реакции и обладают высокой эффективностью. Как правило, живые вакцины получают путем нарушения структуры вирулентных

генов при сохранении способности к репликации [3, 4]. Атенуированные вакцины могут вызывать сильный клеточно-опосредованный и гуморальный иммунный ответ, поскольку используется жизнеспособный, но ослабленный реплицирующийся патоген, который способен размножаться в организме хозяина, что приводит к сильному иммунному ответу, но не вызывает значительных проявлений болезни [5]. Однократной дозы вакцины обычно достаточно, чтобы вызвать стойкий иммунитет. Кроме того, пациенту необходимо вводить лишь небольшое количество вакцины, что обеспечивает максимальную экономическую эффективность. Потенциальная реверсия к вирулентности является одним из критических факторов риска, связанных с живыми аттенуированными вакцинами [5]. Перечень примеров живых аттенуированных вакцин для профилактики вирусных инфекций включает вакцины против кори, эпидемического паротита, краснухи, вакцину против коревой оспы, вакцину против желтой лихорадки и оральную вакцину против полиомиелита; примером живой аттенуированной бактериальной вакцины служит противотуберкулезная вакцина на основе *Bacillus Calmette–Guérin* (БЦЖ).

Некоторые бактерии могут вызывать заболевания, выделяя токсины (анатоксины, другое название – токсиды). Токсоидные вакцины производятся с использованием инактивированных экзотоксинов, продуцируемых патогенными бактериями. Очищенные экзотоксины инактивируются нагреванием, химически или другими видами обработки без изменения иммуногенных свойств [3, 4, 8]. Иммунная система распознает и устраняет эти токсины, что обеспечивает иммунитет к инфицированию. Этот метод ограничен заболеваниями, при которых бактериальные токсины являются их основной причиной. Примером токсидной вакцины является дифтерийно-столбнячно-бесклеточная коклюшная вакцина. Однако вакцины на основе анатоксинов часто обладают побочными эффектами.

Субъединичные вакцины содержат в качестве действующего начала только часть патогена (белок, полисахариды или их комбинацию). Они обычно

содержат от 1 до 20 антигенов. Поскольку в субъединичных вакцинах нет живых патогенов, отсутствует риск изменения вирулентности или серьезных побочных эффектов. Благодаря достижениям в области биотехнологии стало возможным идентифицировать основные антигенные детерминанты патогена. Такие антигенные детерминанты могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Вакцины, полученные таким способом, называются рекомбинантными субъединичными вакцинами. Недостатком таких вакцин является то, что в отдельных случаях достаточно сложно воспроизвести нативную конформацию антигена, входящего в состав вакцины, или его эпитопов. В результате вакцинный белок может оказаться неспособным индуцировать нейтрализующие антитела. Примерами субъединичных вакцин служат вакцины против вируса папилломы человека и вакцины против гепатита В [3, 4, 9].

Конъюгированные вакцины изготавливаются путем ковалентного присоединения бактериальных полисахаридов к белкам. Использование конъюгата белка с полисахаридом для иммунизации обеспечивает длительный защитный иммунитет по сравнению с использованием одного полисахарида [10]. Конъюгирующий белок может быть либо родственным белковым антигеном того же патогенного микроорганизма, который усиливает специфический иммунный ответ на этот патоген, либо иммуногенным белком, который служит адъювантом или стимулятором иммунного ответа. Дифтерийный и столбнячный анатоксины широко используются в качестве носителей в конъюгированных вакцинах. Было показано, что модифицированная версия дифтерийного анатоксина, известная как CRM197 (перекрестно реагирующий материал 197), безопасна и эффективна для людей. Примерами конъюгированных вакцин являются вакцина против *Haemophilus influenzae* типа В и пневмококковые конъюгированные вакцины.

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) представляют собой полипротеиновые структуры вирусного происхождения, способные к самосборке и имитирующие форму и размер нативной вирусной частицы [11,12]. ВПЧ

образуются в результате спонтанного взаимодействия между вирусными структурными белками с образованием конечной структуры, имеющей геометрическую симметрию. ВПЧ делятся на разные категории в зависимости от их структурной сложности. В составе ВПЧ отсутствует вирусный геном, следовательно, они не способны инфицировать клетку-хозяина, что делает их по сравнению с цельным вирусом потенциально более безопасными кандидатами для включения в вакцину. Показано, что из-за высокой повторяемости их антигенных поверхностных эпитопов, ВпЧ обладают иммуногенностью, сходной с иммуногенностью живых аттенуированных вакцин и способны стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [11]. Даже в отсутствие адьювантов ВПЧ вызывают сильный иммунный ответ [13]. Дополнительным преимуществом ВпЧ является возможность загрузки иммуномодуляторов внутрь частицы для повышения эффективности иммунных реакций. Примерами вакцин на основе ВПЧ являются вакцина против вируса папилломы человека и вакцина против гепатита В.

Вакцины на основе нуклеиновых кислот (ДНК- и РНК-вакцины) представляют собой продукт относительно новых вакцинных платформ. Они создаются путем манипуляций с нуклеиновыми кислотами, которые способны обеспечивать синтез большого количества копий вирусных антигенов при иммунизации. Вакцинам на основе нуклеиновых кислот уделяется особое внимание, поскольку они могут обеспечивать быструю разработку и производство вакцин против новых инфекционных заболеваний, таких как COVID-19. Такие вакцины позволяют генерировать в клетках организма эндогенные вирусные белки, имеющие нативную конформацию и присущие вирусам посттрансляционные модификации. Вакцины на основе нуклеиновых кислот вызывают как гуморальный, так и клеточно-опосредованный ответ. Простота вектора, несложная доставка и продолжительность экспрессии являются одними из наиболее важных преимуществами таких вакцин [14].

ДНК-вакцины представляют собой препараты очищенных плазмид, содержащих одну или несколько желаемых последовательностей ДНК, способных вызывать иммунный ответ против патогена [15]. Препараты плазмидной ДНК доставляются в организм различными способами: внутримышечно, подкожно, через слизистые поверхности или трансдермально. После попадания в организм ДНК поглощается клетками, что приводит к экспрессии гена с образованием соответствующих белков внутри клеток [16]. Белки процессируются протеазами хозяина в небольшие антигенные пептиды и презентуются на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). ДНК-вакцины эффективно индуцируют иммунный ответ, безопасны, термостабильны, относительно просты [16]. ДНК-вакцины намного дешевле, чем белковые, цельноклеточные или вирусные вакцины [17]. Для повышения иммуногенности могут быть сконструированы плазмиды, включающие несколько антигенов. Основным недостатком ДНК-вакцин является их низкая иммуногенность из-за низкой скорости трансфекции и последующей низкой экспрессии белка.

Вакцины на основе матричной РНК (мРНК) являются простейшими вакцинами на основе нуклеиновых кислот и многообещающей платформой для разработки вакцин. мРНК-вакцины работают путем доставки мРНК, кодирующей белковый антиген, непосредственно к антиген-презентирующим клеткам *in vivo* [18]. мРНК могут быть эффективно введены в антиген-презентирующие клетки несколькими путями. Как только вакцинная мРНК появляется в клетке, она транслируется в цитоплазме в соответствующие антигенные белки. Белки-антигены затем расщепляются на пептиды и после связывания с белками главного комплекса гистосовместимости (МНС) презентуются на клеточной поверхности [18]. В настоящее время разработаны неамплифицирующиеся и самоамплифицирующиеся мРНК-вакцины [16, 19]. Основным преимуществом мРНК-вакцин является их простота. Они кодируют только интересующий антиген. мРНК можно легко производить массово *in vitro* при низких производственных затратах.

Основным ограничением мРНК-вакцины является низкая стабильность при хранении. Большинство мРНК-вакцин требуют хранения и транспортировки в замороженном состоянии, что представляет проблему при массовой вакцинации. Для повышения внутриклеточной стабильности молекул РНК были разработаны различные методы структурной модификации [20]. Недавно разработанные мРНК- и ДНК-вакцины против SARS-CoV-2 являются лучшими примерами вакцин на основе нуклеиновых кислот. Несколько мРНК-вакцин в настоящее время находятся в стадии разработки, при этом многие мРНК-вакцины проходят клинические испытания [18, 20–22].

Вакцины на основе вирусного вектора представляют собой технологию, аналогичную ДНК-вакцинам, но использующую безвредный или аттенуированный вирус для доставки желаемой ДНК в клетки [23,24]. Генетический материал патогена встраивается в вирус-носитель, который используется для иммунизации. Попадая в организм, такие загруженные вирусы-носители переносят ДНК антигена в клетки хозяина, где он синтезируется и модифицируется. Дополнительно, используемый вирус имитирует естественную инфекцию и тем самым стимулирует иммунную систему. Вакцины на основе вирусных векторов обычно нарабатывают в культуре клеток и их легко производить в больших масштабах. По сравнению с вакцинами на основе нуклеиновых кислот и рекомбинантными субъединичными вакцинами производство вирусных векторных вакцин значительно дешевле. Наиболее известным примером вирусной векторной вакцины являются вакцины против SARS-CoV-2, которые были разработаны с использованием аденовирусного вектора [25].

Использование живых бактерий в качестве вектора для доставки гетерологичного антигена также является эффективной и оригинальной альтернативой для разработки новых вакцин. Иммуностимулирующая способность живых микроорганизмов делает их чрезвычайно эффективной системой для индукции длительного и специфического иммунного ответа против гетерологичных антигенов. Кроме того, бактерии сами по себе

способны выступать в качестве эффективных иммунных адъювантов [26]. Например, в качестве живого бактериального вакцинного вектора, позволяющего индуцировать клеточный иммунный ответ против возбудителей инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований, предложено использовать *Listeria monocytogenes* [27]. Также предложено использовать рекомбинантные молочнокислые бактерии в качестве векторов доставки через слизистую оболочку при создании средств профилактики и лечения воспалительных заболеваний кишечника, аутоиммунных заболеваний, инфицирования патогенными микроорганизмами [28]. Однако существенным ограничением векторных вакцин на основе вирусов и бактерий является возможное наличие у вакцинируемого иммунитета к используемому вектору, что снижает эффективность ответа на целевой антиген вакцины [29].

Вакцины, содержащие убитые или аттенуированные патогены, несут в своем составе полный набор антигенов, что является потенциальным преимуществом, поскольку позволяет добиваться максимального уровня сероконверсии и эффективности защиты. Однако в составе таких вакцин присутствуют дополнительные компоненты, которые не требуются для стимуляции защитных иммунных реакций. Эти компоненты могут снижать эффективность вакцины за счет снижения иммунитета против наиболее важных защитных антигенов [30], направлять иммунные реакции на формирование аллергического или неэффективного иммунного ответа [31], а в некоторых случаях могут причинять вред. Например, присутствие в вакцине углеводов группы А и белка М *Streptococcus pyogenes* провоцирует развитие ревматической болезни сердца [32]. Разработка и производство вакцин, состоящих из полноразмерных патогенов, требует их культивирования [33]. Это не всегда возможно (например, в случае бактериальной природы патогена), а когда возможно, то возникает риск, связанный с безопасностью крупномасштабного культивирования инфекционных агентов. Еще одним риском является способность живых аттенуированных вакцин к репликации, что обычно не вызывает проблем у здоровых людей, но может вызвать

тяжелую инфекцию у лиц с ослабленным иммунитетом, у пожилых людей или беременных. В редких случаях живые аттенуированные вакцины способны к возврату вирулентного состояния, в результате чего у иммунизированных лиц может развиваться заболевание, от которого вакцина должна защитить. Важным ограничением является необходимость бережного хранения и транспортировки вакцины на основе аттенуированного патогена для сохранения его жизнеспособности. Наконец, рекомбинация между различными аттенуированными вакцинными штаммами или между аттенуированными и циркулирующими дикими штаммами патогена может привести к быстрому возникновению вирулентных штаммов и сопутствующих заболеваний. [34]

Перечисленные выше риски применения вакцин на основе полного патогена и безуспешность разработки классических вакцин против заболеваний, вызываемых некоторыми важными патогенами (например, вирус иммунодефицита человека или малярийный плазмодий), подтолкнули к развитию подходы по созданию вакцин, содержащих вместо целых патогенов один или несколько его компонентов [35]. Такие типы вакцин известны как субъединичные вакцины. В их состав обычно включают в качестве антигенов очищенные белки (например, анатоксинные вакцины или вирусоподобные частицы), полисахариды (например, полисахаридная вакцина *Salmonella typhi* Vi), белково-полисахаридные конъюгаты (например, *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), конъюгат капсулярного полисахарида и столбнячного анатоксина (PRP-T)), гликолипиды или липопротеины (например, вакцина Trumenba® Meningococcal group B). Такие вакцины не содержат инфекционного патогена. Их получают с использованием гетерологичных систем экспрессии, синтетических и ферментативных процессов [36-38]. Субъединичные вакцины обладают многими существенными преимуществами по сравнению с традиционными подходами к вакцинации. К ним относятся повышенная безопасность, специфичность, постоянство от партии к партии и стабильность при хранении, а также более широкие возможности для создания вакцинных

антигенов и/или составов для направленного иммунного ответа на специфические эпитопы [39].

Несмотря на свои преимущества, субъединичные вакцины, как правило, менее иммуногенны, чем вакцины, состоящие из целых патогенов. Их более простой антигенный состав приводит к потере сигналов опасности для иммунной системы. Они не способны к репликации и содержат значительно сокращенный репертуар эпитопов, против которых может развиваться иммунный ответ [40]. Использование отдельных пептидов не гарантирует, что большинство иммунизированных людей будут иметь защитный иммунитет [41]. Применение пептидных вакцин также ограничено в случае, когда у патогена присутствует множество различных штаммов или когда последовательность эпитопа может мутировать, не влияя на основные функции антигена-мишени. [42].

Для решения проблемы антигенного многообразия патогена-мишени применяются поливалентные белковые антигены, которые получают путем слияния множества белковых эпитопов или структур в одну молекулу. Содержащая такой антиген вакцина, позволяет вызывать перекрестные защитные реакции против гетерогенных штаммов, патогенов или заболеваний [43].

Для преодоления сниженной иммуногенности субъединичных вакцин, обычно их используют в комбинации с сильными иммуностимулирующими агентами («адьювантами»), или проводят повторную иммунизацию (бустер) чтобы усилить их иммунный ответ в краткосрочной перспективе, а также усилить ослабевающий в течение длительного периода времени иммунный статус [44]. Однако, имеется лишь ограниченное количество безопасных для человека адьювантов, которые используются в лицензированных вакцинах [45].

В то же время, во многих исследованиях было продемонстрировано, что слияние антигенов с иммуностимуляторами белковой природы, вызывает значительно более сильные иммунные ответы по сравнению с простыми

смесями антигена и адьюванта [46-50]. Это связано с тем, что слияние антигенов в одну молекулу с белковыми адьювантами помогает обеспечить поглощение обоих компонентов одной и той же антигенпрезентирующей клеткой [51], а также способствует оптимальному представлению антигенов главным комплексом гистосовместимости для активации В и Т-клеточных ответов [52]. Таким образом, адьювантом активируются только антигенпрезентирующие клетки, которые столкнулись с антигеном. Это, в свою очередь, позволяет уменьшить дозы адьюванта и антигена, снижая риск побочных эффектов [53]. Напротив, когда адьюванты и антигены вводят в виде смеси, каждый компонент может диссоциировать после их введения. В этом случае меньшее количество антигенпрезентирующих клеток будет встречаться как с антигеном, так и с адьювантом, что снижает эффективность иммунного ответа. В то же время, другие клетки будут встречаться только с антигеном или только с адьювантом, что может иметь нежелательные последствия, такие как развитие иммунологической толерантности или стимуляция адьювантом иммунного ответа против собственных антигенов [54].

В связи с тем, что слияние антигена с адьювантом приводит к значительному усилению иммунного ответа, особенно для стимуляции цитотоксических лимфоцитов [55-57], разработка платформ и технологий для слияния антиген-адьювант, предоставляет значительные возможности для последующего получения вакцин следующего поколения. Поскольку в большинстве случаев антигенные детерминанты представлены на белках, методы, обеспечивающие генетическое слияние и прямую экспрессию таких антигенов с белковыми адьювантами, представляют собой простой процесс создания новых вакцин [58]. Кроме того, для таких типов вакцин в биотехнологической промышленности разработаны крупномасштабные процессы производства белка, что обеспечивает простоту их производства. Также они не требуют использования какой-либо сложной химии и могут быть дополнительно улучшены за счет их включения в системы доставки.

Еще одним применением слитых белков является разработка новых систем доставки антигена. Например, получение вирусоподобных частиц или белковых наночастиц, содержащих слитые белки, позволяет улучшить поглощение и представление антигенов, а также активировать врожденную иммунную систему. При этом сочетание обоих подходов (слияние с адьювантом и формирование наноразмерных структур) дает наилучшие возможности для производства сильнодействующих вакцин [59].

К настоящему времени накоплено множество экспериментальных данных, позволивших определить небольшие пептидные В- и Т-клеточные эпитопы, вызывающие протективные иммунные реакции на различные патогены. В дополнение к этому разработаны компьютерные программы, позволяющие на основе структуры белков вычислять эпитопы как для протективных или нейтрализующих антител [60]. Такие эпитопы используются для конструирования мультиэпитопных иммуногенов путем их слияния в одну молекулу. Для этого используют два подхода. В первом эпитопы объединяются последовательно, с образованием гибридного полиэпитопного белка. Такой подход нашел применение при создании отечественной вакцины против ВИЧ-1. Авторами с помощью метода фагового дисплея были определены пептиды, которые были использованы как имитаторы Т- и В-клеточных конформационных эпитопов белков env и gag ВИЧ-1. Было показано, что у мышей, иммунизированных иммуногеном, состоящим из таких пептидов, слитых в одну молекулу, происходит наработка антител, нейтрализующих лабораторные штаммы ВИЧ-1 [61].

Во втором подходе чужеродные эпитопы различных патогенных штаммов или факторов вирулентности интегрируются в основной белок-носитель для имитации нативной антигенности эпитопа. Это делается с таким расчетом, чтобы сохранить нативную конформацию после интеграции в основной белок. Если в белок носитель встраивается несколько защитных эпитопов от разных штаммов или геновариантов патогена, то полученный поливалентный антиген с высокой вероятностью будет вызывать

перекрестный иммунный ответ. Примером построенного таким образом иммуногена может служить белок VP1 enterovirus 71 (EV71) в который были встроены эпитопы coxsackievirus A16 (CA16). Антитела, полученные после иммунизации таким иммуногеном, защищали новорожденных мышат от летальных доз EV71 и CA16 [62].

### Список литературы

1. Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges // *Virology*. – 2015. – Vol. 479-480. – P. 379-392.
2. Huang Q., Yu W. et. al. Potent Antigen-Adjuvant Delivery System by Conjugation of Mycobacterium tuberculosis Ag85B-HspX Fusion Protein with Arabinogalactan-Poly(I:C) Conjugate // *Bioconj Chem*. – 2016. – Vol. 27, Suppl. 4. – P. 1165-1174. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00116.
3. Yadav D.K., Yadav N. et. al. Vaccines: Present Status and Applications // *Animal Biotechnology*. – 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00026-2>.
4. Karch C.P., Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies // *Biochem Pharmacol*. – 2016. – Vol. 120, Suppl. 4. – P. 1-14. doi: 10.1016/j.bcp.2016.05.001.
5. Clem A.S. Fundamentals of vaccine immunology // *J. Glob. Infect. Dis*. – 2011. – Vol. 3, Suppl. 1. – P. 73-78. doi: 10.4103/0974-777X.77299.
6. Sanders B., Koldijk M. et al. *Inactivated Viral Vaccines // Vaccine Anal. Strateg. Princ. Control. Dis*. – 2014. – P. 45-80.
7. D'Amico C., Fontana F. et al. Development of vaccine formulations: past, present, and future // *Drug Deliv Transl Res*. – 2021. – Vol. 11, Suppl. 2. – P. 353-372. doi: 10.1007/s13346-021-00924-7.
8. Vetter V., Denizer G. et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know // *Ann Med*. – 2018. – Vol. 50, Suppl. 2. – P. 110-120. doi: 10.1080/07853890.2017.1407035.

9. Thomas S., Luxon B.A. Vaccines based on structure-based design provide protection against infectious diseases // *Expert Rev. Vaccines*. – 2013. – Vol. 12, Suppl. 11. – P. 1301-1311. doi: 10.1586/14760584.2013.840092.
10. Pichichero M.E. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials // *Hum. Vaccin Immunother*. – 2013. – Vol. 9, Suppl. 12. – P. 2505-2523. doi: 10.4161/hv.26109.
11. Nooraei S., Bahrulolum H. et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers // *J. Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. 59. doi: 10.1186/s12951-021-00806-7.
12. Noad R., Roy P. Virus-like particles as immunogens // *Trends Microbiol*. – 2003. – Vol. 11, Suppl. 9. – P. 438-444. doi: 10.1016/s0966-842x(03)00208-7.
13. Zhang L.F., Zhou J. et al. HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man // *Vaccine*. – 2000. – Vol. 18, Suppl. 11-12. – P. 1051-1058. doi: 10.1016/s0264-410x(99)00351-5.
14. Vogel F.R., Sarver N. Nucleic acid vaccines // *Clin. Microbiol. Rev*. – 1995. – Vol. 8, Suppl. 3. – P. 406-410. doi: 10.1128/CMR.8.3.406.
15. Liu M.A., Wahren B. et al. DNA vaccines: recent developments and future possibilities // *Hum. Gene Ther*. – 2006. – Vol. 17, Suppl. 11. – P. 1051-1061. doi: 10.1089/hum.2006.17.1051.
16. Qin F., Xia F. et al. A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications // *Front. Cell. Dev. Biol*. – 2021. – Vol. 9. – P. 633776. doi: 10.3389/fcell.2021.633776.
17. Suschak J.J., Williams J.A. et al. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity // *Hum. Vaccin Immunother*. – 2017. – Vol. 13, Suppl. 12. – P. 2837-2848. doi: 10.1080/21645515.2017.1330236.

18. Pardi N., Hogan M.J. et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2018. – Vol. 17, Suppl. 4. – P. 261-279. doi: 10.1038/nrd.2017.243.
19. Wallis J., Shenton D.P. et al. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies // *Clin. Exp. Immunol.* – 2019. – Vol. 192, Suppl. 2. – P. 189-204. doi: 10.1111/cei.13287.
20. Sahin U., Karikó K. et al. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2014. – Vol. 13, Suppl. 10. – P. 759-780. doi: 10.1038/nrd4278.
21. Kauffman K.J., Webber M.J. et al. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics // *J. Control. Release.* – 2016. – Vol. 240. – P. 227-234. doi: 10.1016/j.jconrel.
22. Grunwitz C., Kranz L.M. mRNA Cancer Vaccines-Messages that Prevail // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2017. – Vol. 405. – P. 145-164. doi: 10.1007/82\_2017\_509.
23. Rollier C.S., Reyes-Sandoval A. et al. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – Vol. 23, Suppl. 3. – P. 377-382. doi: 10.1016/j.coi.2011.03.006.
24. Ewer K.J., Lambe T. et al. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact // *Curr Opin Immunol.* – 2016. – Vol. 41. – P. 47-54. doi: 10.1016/j.coi.2016.05.014.
25. Lundstrom K. Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13, Suppl. 2. – P. 317. doi: 10.3390/v13020317.
26. Ding C., Ma J. et al. Live bacterial vaccine vector and delivery strategies of heterologous antigen: A review // *Immunol. Lett.* – 2018. – Vol. 198. – P. 70-77. doi: 10.1016/j.imlet.2018.03.006.
27. Bruhn K.W., Craft N. et al. *Listeria* as a vaccine vector // *Microbes Infect.* – 2007. – Vol. 9, Suppl. 10. – P. 1226-1235. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.010.

28. Wang M., Gao Z. et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 100, Suppl. 13. – P. 5691-5701. doi: 10.1007/s00253-016-7557-x.
29. Roberts D.M., Nanda A. et al. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity // *Nature.* – 2006. – Vol. 441, Suppl. 7090. – P. 239-213. doi: 10.1038/nature04721.
30. Donati C., Rappuoli R. Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2013. – Vol. 1285. – P.115-132. doi: 10.1111/nyas.12046.
31. Jones L.H. Recent advances in the molecular design of synthetic vaccines // *Nat. Chem.* – 2015. – Vol. 7, Suppl. 12. – P. 952-960. doi: 10.1038/nchem.2396.
32. Cunningham M.W. Post-Streptococcal Autoimmune Sequelae: Rheumatic Fever and Beyond // *Basic Biology to Clinical Manifestations.* – 2016.
33. Brito L.A., Malyala P. et al. Vaccine adjuvant formulations: a pharmaceutical perspective // *Semin. Immunol.* – 2013. – Vol. 25, Suppl. 2. – P. 130-145. doi: 10.1016/j.smim.2013.05.007.
34. Becher P., Orlich M. et al. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease // *J. Virol.* – 2001. – Vol. 75, Suppl. 14. – P. 6256-6264. doi: 10.1128/JVI.75.14.6256-6264.2001.
35. Moyle P.M., Toth I. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities // *ChemMedChem.* – 2013. – Vol. 8, Suppl. 3. – P. 360-376. doi: 10.1002/cmdc.201200487.
36. Berti F., Adamo R. Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives // *ChemMedChem.* – 2013. – Vol. 8, Suppl. 8. – P. 1653-1663. doi: 10.1021/cb400423g.
37. Luo Y., Friese O.V. et al. The Dual Role of Lipids of the Lipoproteins in Trumenba, a Self-Adjuvanting Vaccine Against Meningococcal Meningitis B

- Disease // AAPS J. – 2016. – Vol. 18, Suppl. 6. – P. 1562-1575. doi: 10.1208/s12248-016-9979-x.
38. Moyle P.M., Dai W. et al. Combined synthetic and recombinant techniques for the development of lipoprotein-based, self-adjuvanting vaccines targeting human papillomavirus type-16 associated tumors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 25, Suppl. 23. – P. 5570-5575. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.10.049.
39. Foged C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems // *Ther. Deliv.* – 2011. – Vol. 2, Suppl. 8. – P. 1057-1077. doi: 10.4155/tde.11.68.
40. Brito L.A., Malyala P. et al. Vaccine adjuvant formulations: a pharmaceutical perspective // *Semin. Immunol.* – 2013. – Vol. 25, Suppl. 2. – P. 130-145. doi: 10.1016/j.smim.2013.05.007.
41. Moyle P.M. Progress in vaccine development // *Curr. Protoc. Microbiol.* – 2015. – Vol. 36. – P. 18.1.1-18.1.26. doi: 10.1002/9780471729259.mc1801s36.
42. Grandi G., Nagy E. *Finding protective bacterial antigens* // *Development of Novel Vaccines.* – 2012.
43. Seo H., Duan Q. et al. Vaccines against gastroenteritis, current progress and challenges // *Gut Microbes.* – 2020. – Vol. 11, Suppl. 6. – P. 1486-1517. doi: 10.1080/19490976.2020.1770666.
44. Savelkoul H.F., Ferro V.A. et al. Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines // *Vaccines (Basel).* – 2015. – Vol. 3, Suppl. 1. – P. 148-171. doi: 10.3390/vaccines3010148.
45. Lee S., Nguyen. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases // *Immune Netw.* – 2015. – Vol. 15, Suppl. 2 – P. 51-57. doi: 10.4110/in.2015.15.2.51.
46. Bates J.T., Graff A.H. et al. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell response independently

- of TLR5 and MyD88 // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186, Suppl. 11. – P. 6255-6262. doi: 10.4049/jimmunol.1001855.
47. Garaude J., Kent A. et al. Simultaneous targeting of toll- and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 4, Suppl. 120. – P. 120ra16. doi: 10.1126/scitranslmed.3002868.
48. Huleatt J.W., Jacobs A.R. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25, Suppl. 4. – P. 763-775. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.08.013.
49. Kreutz M., Giquel B. et al. Antibody-antigen-adjuvant conjugates enable co-delivery of antigen and adjuvant to dendritic cells in cis but only have partial targeting specificity // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, Suppl. 7. – P. e40208. doi: 10.1371/journal.pone.0040208.
50. Zom G.G., Khan S. et al. TLR ligand-peptide conjugate vaccines: toward clinical application // *Adv Immunol.* – 2012. – Vol. 114. – P. 177-201. doi: 10.1016/B978-0-12-396548-6.00007-X.
51. Kastenmüller W., Kastenmüller K. et al. Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 14, Suppl. 10. – P. 705-711. doi: 10.1038/nri3727.
52. Blander J.M., Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors // *Science.* – 2004. – Vol. 304, Suppl. 5673. – P. 1014-1018. doi: 10.1126/science.1096158.
53. Wille-Reece U., Wu C.Y. et al. Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174, Suppl. 12. – P. 7676-7683. doi: 10.4049/jimmunol.174.12.7676.
54. Kreutz M., Giquel B. et al. Antibody-antigen-adjuvant conjugates enable co-delivery of antigen and adjuvant to dendritic cells in cis but only have partial

- targeting specificity // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, Suppl. 7. – P. e40208. doi: 10.1371/journal.pone.0040208.
55. Garaude J., Kent A. et al. Simultaneous targeting of toll- and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses specificity // Sci Transl. Med. – 2012. – Vol. 4, Suppl. 120 – P. 120ra16. doi: 10.1126/scitranslmed.3002868.
56. Huleatt J.W., Jacobs A.R. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, Suppl. 4 – P. 763-75. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.08.013.
57. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185, Suppl. 10. – P. 5677-5682. doi: 10.4049/jimmunol.1002156.
58. Knudsen N.P., Olsen A. et al. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 19570. doi: 10.1038/srep19570. PMID: 26791076.
59. Moyle P.M. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines // Biotechnol. Adv. – 2017. – Vol. 35, Suppl. 3. – P. 375-389. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.005.
60. De Groot A.S., Moise L. et al. Better Epitope Discovery, Precision Immune Engineering, and Accelerated Vaccine Design Using Immunoinformatics Tools // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 442. doi: 10.3389/fimmu.2020.00442.
61. Чикаев А.Н., Щербакова Н.С. и др. Разработка искусственных полиэпитопных В-клеточных иммуногенов в качестве вакцин против ВИЧ-1 // Бюллетень ВСНЦ СЦЦ РАМН. – 2011. – Т. 3 (79). – P. С. 229-232.
62. Luo J., Huo C. et. al. Chimeric enterovirus 71 virus-like particle displaying conserved coxsackievirus A16 epitopes elicits potent immune responses and

protects mice against lethal EV71 and CA16 infection // *Vaccine*. – 2021. –  
Vol. 39, Suppl. 30 – P. 4135-4143. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.05.093.

## Иммунологическая память

Долговременная иммунологическая память представляет собой уникальную функцию адаптивного иммунитета, выработанную в ходе эволюции для поддержания долгосрочного выживания видов позвоночных путем защиты от нарушителей внутреннего равновесия, то есть инфекционных агентов или нежелательных (например, опухолевых) клеток. Иммунологическая память обычно развивается в ходе инфицирования путем образования Т-клеток и В-клеток памяти. Они сохраняются в течение длительного времени и в случае повторного заражения быстро запускают вторичные защитные реакции. Адаптивная иммунная система и сцепленная с ней долговременная иммунологическая память появились у позвоночных около 450 миллионов лет назад. Необходимость их появления с точки зрения теории Дарвиновской эволюции была вызвана у позвоночных более высокой продолжительностью жизни и низкой репродуктивной способностью позвоночных по сравнению с беспозвоночными животными. Последние обладают только врожденным иммунитетом, появившимся более 1 миллиарда лет назад и сохранившимся без каких-либо фундаментальных изменений на сегодняшний день. Так, насекомые не нуждаются в долговременной иммунологической памяти об инфекции, поскольку у них очень короткая жизнь, и они дают огромное количество потомков, позволяющее виду выжить [1].

Первое описание иммунологической памяти восходит к древнегреческому историку Фукидиду, который в своих работах о вспышке чумы, уничтожившей афинян во время Пелопоннесской войны против Спарты (443-404 гг. до н.э.), сообщил, что люди, выздоровевшие после инфекции, больше не болеют. Развитие эффективных адаптивных иммунных реакций против нарушителей внутреннего равновесия в виде инфекционных агентов или внутренних повреждений и опухолей требует, чтобы наивные Т- или В-лимфоциты получали полноценные сигналы для активации и последующего созревания в клоны эффекторных клеток. Это должны быть антигенные

сигналы в виде презентруемых молекулами главного комплекса гистосовместимости пептидов, соответствующих эпитомам антигенов. Кроме того, необходимы костимулирующие сигналы и сигналы дифференцировки. Такие сигналы подаются профессиональными антиген-презентирующими клетками в виде мембранной экспрессии белков или секреции белковых молекул. Профессиональные антиген-презентирующие клетки, в свою очередь, активируются и созревают под воздействием появившихся в организме патогенов. Профессиональные антиген-презентирующие клетки (в основном дендритные клетки миелоидного или моноцитарного происхождения) постоянно патрулируют ткани и при появлении патогенов рецептируют их с последующим поглощением, переработкой до пептидных фрагментов (процессинг). Они мигрируют в близлежащие лимфоузлы и презентируют наивным Т-клеткам пептиды, представляющие собой эпитопы компонентов патогенов. Такие пептиды презентируются в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости. Дополнительные активационные сигналы поступают от костимулирующих молекул, присутствующих на мембране профессиональных антиген-презентирующих клеток. Одновременно активирующиеся наивные Т-клетки получают сигнал дифференцировки в виде цитокинов, взаимодействующих с рецепторами на мембране лимфоцитов. Только в этих условиях одиночные антигенспецифические наивные Т-клетки созревают в эффекторные Т-лимфоциты, давая клоны численностью до сотен и тысяч клеток и генерируя долговременную память.

Сформировавшиеся эффекторные  $CD4^+$  Т-хелперные клетки и  $CD8^+$  Т-цитотоксические клетки играют различные роли в иммунном ответе. Первые помогают клеткам и иммунной системы выполнять свои функции. Они регулируют активность различных клеток, активируя или угнетая их, помогают В-клеткам вырабатывать антитела, в некоторых условиях могут приобретать цитотоксическую функцию. Вторые клетки в основном являются

антигенспецифичными цитотоксическими клетками. Они также могут продуцировать различные типы цитокинов.

Появившиеся в ходе иммунного ответа Т-клетки памяти относятся к нескольким популяциям Т-лимфоцитов в зависимости от характера экспрессии молекул адгезии и рецепторов хемокинов, обеспечивающих различные пути миграции этих клеток. Центральные Т-клетки памяти экспрессируют высокий уровень маркеров хоминга CD62L и CCR7, направляющих клетки в лимфоидные ткани. Эти клетки непрерывно циркулируют через кровотоки к лимфоидным органам. Считается, что они длительное время сохраняются в организме за счет постоянной пролиферации, зависящей от IL-7 и/или IL15, но не требующей для этого наличия антигена. Они продуцируют IL-2 и обладают высоким потенциалом самообновления, а также активно пролиферируют при повторном контакте с антигеном [2, 3].

Вторая популяция Т-клеток памяти - эффекторные Т-клетки памяти. Потенциал пролиферации у них низок, лимфоидные маркеры хоминга отсутствуют. Вследствие этого они не способны мигрировать в лимфоидные ткани. При этом такие клетки имеют разнообразные наборы белков, позволяющих им мигрировать в ткани, в том числе при воспалении, и быстро выполнять эффекторные функции в соответствии с типом периферической ткани и цитокиновой средой, в которую они попадают.

Третья популяция клеток памяти – это периферические Т-клетки памяти. Они несут маркер CX3CR1 и способны мигрировать из крови в ткани и лимфатические узлы. Эта популяция обладает более высокой способностью к самообновлению и пролиферации, чем обычные Т-клетки. Выполняет цитотоксическую функцию и локализуется в нелимфоидных тканях.

Идентифицирован также пул CD8<sup>+</sup> Т-клеток тканевой памяти (T<sub>RM</sub>). Они длительное время сохраняются в нелимфоидных тканях, экспрессируют транскрипционную сигнатуру, общую с эффекторными и центральными Т-клетками памяти.

Какие именно Т-клетки памяти может дать созревающий наивный Т-лимфоцит зависит от множества обстоятельств. Существует гипотеза “одна клетка, множество судеб”, согласно которой одна наивная Т-клетка (с одной специфичностью) генерирует множество фенотипически и функционально различных эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти с одним и тем же Т-клеточным рецептором [4]. Альтернативой является гипотеза “одна клетка, одна судьба”, согласно которой отдельные клоны Т-клеток с различной степенью сродства к данному пептиду выбирают уникальные судьбы для каждого отдельного клона: например, один клон станет Th1, другой Th2, еще один Th17). Вероятно, популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток могут развиваться у людей в соответствии с обеими гипотезами. Так, известно, что одиночные наивные CD4-положительные клетки или Т-клетки памяти, инициированные различными патогенами (*Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, столбнячный анатоксин) *in vitro*, могут проживать множественные судьбы, то есть превращаться в клетки Th1, Th2 и Th17 с различной миграционной способностью. В свою очередь эти клетки могут давать клоны, поляризующиеся как в сторону единой судьбы, так и клоны, потомство которых обладает множественными судьбами [5].

Вакцинация представляет собой моделирование событий, связанных с инфицированием с целью развития оптимального иммунного ответа. Случайная или специально создаваемая при конструировании вакцин комбинация нескольких событий (например, сродство к Т-клеточному рецептору, природа костимулирующих сигналов, цитокиновая среда, тип и доза антигенов, продолжительность воздействия антигена) может

обуславливать разные судьбы Т-клеток. Структурно-функциональные особенности созревающих Т-клеток определяются многими транскрипционными и эпигенетическими факторами. В целом, они обеспечивают высокий уровень пластичности отдельных Т-клеток памяти, которые, таким образом, могут использовать различные альтернативные стратегии для борьбы с каждым типом патогенов, а также для поддержания долговременной памяти. В связи с этим важным является вопрос о том, как осуществляется регуляция диверсификации Т-клеток памяти. Понимание механизмов, отвечающих за тонкую настройку иммунологической памяти, важно для эффективной стратегии создания вакцинных препаратов. Баланс между развитием памяти Т-клеток и различными механизмами иммунорегуляции (а именно, истощением эффекторных Т-клеток и подавлением регуляторных Т-клеток) определяет судьбу формирования защитных реакций при различных состояниях, таких как острая или хроническая инфекция, вакцинация, рак и аутоиммунные расстройства.

Полноценный ответ на большинство острых инфекций или на вакцинацию против родственных патогенов (например, оспы, паротита, краснухи, ветряной оспы, кори, дифтерии, полиомиелита, менингококков, вируса гепатита А, В) сопровождается выработкой защитных адаптивных эффекторных реакций, то есть наработкой эффекторных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, нейтрализующих антител, и развитием долговременной памяти. Высокоаффинные Т-клеточные рецепторы и корецепторы (CD4 или CD8) наивных Т-клеток после получения устойчивых антигенных сигналов от антиген-презентирующих клеток запускают внутриклеточные сигнальные каскады путем последовательного фосфорилирования множества сигнальных молекул (например, ITAM, ZAP70, LCK, LAT, PLC $\gamma$  и др.), что в конечном итоге приводит к транслокации в ядро различных факторов транскрипции, например, NF $\kappa$ B, NFAT). Последние через консервативные ДНК-связывающие домены вызывают экспрессию широкого ряда генов, связанных с активацией Т-клеток и формированием памяти [6-8].

Костимулирующие молекулы на наивных Т-клетках усиливают каскад сигналов активации посредством фосфорилирования дополнительных мессенджеров, необходимых для активации Т-клеток. В отсутствие костимулирующих сигналов может быть вызвана анергия Т-клеток, приводящая к исключению их из числа активируемых клеток.

Эффективная мощность сигнала для Т-клеточного рецептора должна быть временной, а не постоянной, чтобы избежать длительной экспрессии генов, связанных с “истощением Т-клеток” и гарантировать, таким образом, полноценные эффекторные реакции Т-клеток и генерацию долговременной памяти. Было высказано предположение, что короткая продолжительность передачи сигналов Т-клеточному рецептору индуцирует временное деметилирование ДНК локуса *Pdcd1* (кодирующего PD-1) с последующим повторным метилированием *Pdcd1*, которое совпадает с эффекторными функциями, направленными на борьбу с патогенами [9]. На поздней фазе активации, то есть при полной элиминации из организма патогена, активируется широкий репертуар ингибирующих сигналов. Он включает экспрессию на мембране белков, называемых точками иммунного контроля, а также сход с мембраны путем интернализации или шеддинга во внеклеточное пространство молекул, участвующих в активации клеток [10]. Этот иммунорегуляторный механизм выбран в ходе эволюции для прекращения иммунных реакций, которые бесполезны или даже вредны при отсутствии источника инфекции. В этих условиях эффекторные Т-клетки погибают, тогда как клетки памяти, отобранные по специфичности и функции, сохраняются в отсутствие антигена, но в случае повторного заражения быстро генерируют новое потомство эффекторных иммунных клеток. Сигналы, вызывающие сбой эффекторных реакций, также могут влиять на развитие иммунологической памяти.

Появление и распространение каждой из популяций Т-клеток памяти сопровождается разнообразными эпигенетическими, транскрипционными и протеомными изменениями [11-16]. Инфицирование или вакцинация приводят у эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти к изменениям в профиле метилирования ДНК, к модификации гистонов и транскриптома. Долгоживущие Т-клетки памяти имеют транскриптом, сходный с транскриптомом наивных Т-лимфоцитов, но открытую карту хроматина, подобную эффекторным Т-клеткам. В частности, у них обнаружено деметилирование генов *IFNG* и *GZMB* и наличие открытого хроматина вблизи их промоторов. Видимо это отражает детали механизма, с помощью которого Т-клетки памяти быстро проявляют свои эффекторные функции [17]. Кроме того, у наивных клеток и Т-клеток памяти, но не у эффекторных клеток, в генах *IL-7R* и *BCL-2* обнаружены открытые участки хроматина. Это позволило предположить, что клетки памяти сохраняют важные молекулярные особенности наивных клеток, связанные с выживанием и самообновлением. Показано также, что для поддержания долговечности и способности к самообновлению Т-клеток памяти требуется поддержание транскрипции гена *FOXO1*, а эпигенетический фактор *PRC2* после устранения инфицирования обеспечивает подавление активности генов, связанных с функциями эффекторных Т-клеток [18-21]. В понимании механизмов формирования иммунологической памяти остается множество нерешенных вопросов. В частности, неясно, каким образом формируется долговременная или кратковременная память после различных инфекций или разных способов вакцинации. Большинство современных вакцин вводятся подкожно и вызывают долговременную память в отношении патогенов, на которые они направлены (например, оспы, паротита, краснухи, ветряной оспы, кори, дифтерии, полиомиелита, менингококков, виру гепатита А). Напротив, иммунологическая память, возникающая в результате инфицирования SARS-CoV-2, вирусами гриппа обычно кратковременна. Предполагается, что для создания долговременной защиты при этих инфекциях необходимы намного

более высокие иммунные реакции на уровне верхних дыхательных путей легких [22]. В частности, вакцины, вводимые через слизистые дыхательных путей (ворота для вирусов, таких как атипичная пневмония, обычная простуда или грипп), вероятно, должны вызывать более эффективные иммунные реакции в этих участках, чем существующие вакцины, вводимые подкожно [23]. При острой инфекции антигенспецифические наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки достаточно быстро активируются и дифференцируются в эффекторные клетки. После устранения антигена 5-10% этих эффекторных Т-клеток становятся клетками памяти, которые обеспечивают более надежную и долговременную защиту от ранее встречавшихся патогенов [24]. Однако при онкологических заболеваниях и хронических инфекциях, где сохраняются антигены, CD8<sup>+</sup> Т-клетки постепенно переходят в дисфункциональное состояние истощения [25]. Все большее число исследований показывает, что пулы памяти и истощенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки гетерогенны и состоят из отдельных субпопуляций, которые различаются с точки зрения их фенотипа, функции и местоположения в организме [26]. Эта гетерогенность отражает сложную природу иммунной системы и необходимость в разнообразных специализированных иммунных клетках для эффективного реагирования на широкий спектр патогенов и вызовы окружающей среды [27].

Известно, что при хронической инфекции или раке антигенспецифические CD8<sup>+</sup> Т-клетки с большим трудом переходят в функциональные Т-клетки памяти. Хроническая стимуляция антигеном изменяет костимулирующую и коингибирующую передачу сигналов, а хроническое воспаление заставляет CD8<sup>+</sup> Т-клетки проходить уникальный процесс дифференцировки, широко известный как истощение Т-клеток. Истощение Т-клеток характеризуется прогрессирующей потерей эффекторной функции, включая цитотоксичность и способность продуцировать цитокины. Например, сообщалось, что истощенные клетки продуцируют низкие уровни цитокинов, включая IL-2, фактор некроза опухоли (TNF) и гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ), и меньшее

количество цитотоксических эффекторных молекул, включая перфорин и гранзимы. Другой ключевой особенностью истощения Т-клеток является экспрессия множества ингибирующих рецепторов (IRS), включая PD1, TIM3, CTLA-4, LAG3, TIGIT, CD160, VTLA и 2B4 (CD244) [28, 29].

В свою очередь острые вирусные инфекции, развивающиеся за короткий период времени, приводят, как правило, к инициации сильных эффекторных реакций и долговременной памяти. Снижение костимулирующих и усиление коингибирующих сигналов способствуют истощению Т-клеток. Истощение является важным фактором, влияющим на формирование памяти и адаптивный иммунный ответ в целом. На его развитие способны воздействовать колебания метаболизма клеток, старение, часто сопровождающее хроническое воспаление. В результате многие Т-клетки могут быть потеряны или истощены, что отразится на эффективности вакцинации [30].

### Список литературы

63. Barnaba V. T. Cell Memory in Infection, Cancer, and Autoimmunity // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 12. P. – 811968. doi: 10.3389/fimmu.2021.811968
64. Lau L.L., Jamieson B.D., Somasundaram T. et al. Cytotoxic T-cell memory without antigen // *Nature.* – 1994. – Vol. 369, Suppl. 6482. – P. 648-652. doi: 10.1038/369652a0.
65. Swain S.L., Hu H., Huston G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors // *Science.* – 1999. – Vol. 286, Suppl. 5443. – P. 1381-1383. doi: 10.1126/science.286.5443.1381
66. Buchholz V.R., Schumacher T.N., Busch DH. T Cell Fate at the Single-Cell Level // *Annu. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol. 34. – P. 65-92. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112014
67. Becattini S., Latorre D., Mele. et al. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4<sup>+</sup> T cell clones primed by pathogens or vaccines //

- Science. – 2015. – Vol. 347, Suppl. 6220. – P. 400-406.  
doi: 10.1126/science.1260668
68. Germain R.N., Stefanová I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 467-522.  
doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.467.
69. Gaud G., Lesourne R., Love P.E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signaling // *Nat Rev Immunol.* – 2018. – Vol. 18, Suppl. 8. – P. 485-497.  
doi: 10.1016/j.tibs.2017.11.008.
70. Mørch A.M., Bálint Š., Santos AM. et al. Coreceptors and TCR Signaling - the Strong and the Weak of It // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 597627. doi: 10.3389/fcell.2020.597627.
71. Youngblood B., Oestreich K.J., Ha S.J. et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells // *Immunity.* – 2011. – Vol. 35, Suppl. 3. – P. 400-412.
72. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy // *Cell Res.* – 2020. – Vol. 30, Suppl. 80. – P. 660-669.
73. Farber D.L., Netea M.G., Radbruch A. et al. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol. 16, Suppl. 2. – P. 124-128.
74. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 745-763.
75. Buchholz V.R., Schumacher T.N., Busch D.H. T Cell Fate at the Single-Cell Level maintenance // *Annu. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol. 34. – P. 65-92.
76. Youngblood B., Hale J.S., Kissick H.T. et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells // *Nature.* – 2017. – Vol. 552, Suppl. 7685. – P. 404-409.
77. Hudson W.H., Gensheimer J., Hashimoto M. et al. Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-

- 1<sup>+</sup> Stem-like CD8<sup>+</sup> T Cells during Chronic Infection // *Immunity*. – 2019. – Vol. 51, Suppl. 6. – P. 1043-1058.
78. Buenrostro J.D., Giresi P.G., Zaba L.C. et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position // *Nat. Methods*. – 2013. – Vol. 10, Suppl. 12. – P. 1213-1218.
79. Akondy R.S., Fitch M., Edupuganti S. et al. Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination position // *Nature*. – 2017. – Vol. 552, Suppl. 7685. – P. 362-367.
80. Delpoux A., Michelini R.H., Verma S. et al. Continuous activity of Foxo1 is required to prevent anergy and maintain the memory state of CD8<sup>+</sup> T cells // *J. Exp. Med*. – 2018. – Vol. 215, Suppl. 2. – P. 575-594.
81. Utzschneider D.T., Delpoux A., Wieland D. et al. Active Maintenance of T Cell Memory in Acute and Chronic Viral Infection Depends on Continuous Expression of FOXO1 cells // *Cell Rep*. – 2018. – Vol. 22, Suppl. 13. – P. 3454-3467.
82. Gray S.M., Amezcua R.A., Guan. et al. Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8<sup>+</sup> T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency // *Immunity*. – 2017. – Vol. 46, Suppl. 4. – P. 596-608.
83. Kakaradov B., Arsenio J., Widjaja C.E. et al. Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8<sup>+</sup> T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing cells // *Nat. Immunol*. – 2017. – Vol. 18, Suppl. 4. – P. 422-432.
84. Hayward S.L., Scharer C.D., Cartwright E.K. et al. Environmental cues regulate epigenetic reprogramming of airway-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells // *Nat. Immunol*. – 2020. – Vol. 21, Suppl. 3. – P. 309-320.
85. Barnaba V. T Cell Memory in Infection, Cancer, and Autoimmunity // *Front. Immunol*. – 2022. – Vol. 12. – P. 811968.

86. Joshi N.S., Cui W., Chandele A. et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor // *Immunity*. – 2007. – Vol. 27, Suppl. 2. – P. 281-295.
87. Blank C.U., Haining W.N., Held W. et al. Defining 'T cell exhaustion' // *Nat. Rev. Immunol.* – 2019. – Vol. 19, Suppl. 11. – P. 665-674.
88. Chen Z., Ji Z., Ngiow S.F. TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision // *Immunity*. – 2019. – Vol. 51, Suppl. 5. – P. 840-855.
89. Chen Y., Xu Z., Sun H. et al. Regulation of CD8<sup>+</sup> T memory and exhaustion by the mTOR signals // *Cell Mol. Immunol.* – 2023. – Vol. 20, Suppl. 9. – P. 1023-1039.
90. McLane L.M., Abdel-Hakeem M.S., Wherry E.J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer signals // *Annu Rev. Immunol.* – 2019. – Vol. 37. – P. 457-495.
91. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15, Suppl. 8. – P. 486-499.
92. Fuertes Marraco S.A., Neubert N.J., Verdeil G. et al. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 310.

## Адьюванты

Адьювантами являются различные соединения, которые усиливают иммуногенность вакцин. Их химическая природа может различаться в широких пределах. Первые свидетельства использования адьювантов появились почти сто лет назад, в 1926 году, когда Александр Гленни обнаружил, что смешивание солей алюминия с антигенами и инъекция их морским свинкам индуцируют больше антител, чем введение одних только антигенов. В 1940-х годах Фрейнд и его коллеги разработали эмульсии "вода в масле", что привело к созданию адьюванта Фрейнда [1]. Однако адьювант Фрейнда так и остался не лицензирован для использования в вакцинах для людей из-за их высокой токсичности. В связи с этим с 1920-х по 1990-е годы лицензировались только алюминиевые адьюванты, несмотря на усилия по разработке новых адьювантов. Только в 1997 году эмульсия масло-в-воде MF59 была лицензирована в качестве адьюванта для противогриппозных вакцин. В последующие годы были лицензированы другие аналогичные адьюванты (AS04, AS03, AS01 и CpG ODN 1018) [2]. В качестве адьювантов, кроме того, было предложено множество других соединений, включая минеральные соли, продукты жизнедеятельности микроорганизмов, эмульсии, сапонины, синтетические низкомолекулярные агонисты, полимеры, наночастицы и липосомы [3]. Показано, что они повышают силу, широту и персистенность иммунных реакций.

Адьюванты повышают иммуногенность вакцин. Вакцины без адьювантов индуцируют умеренную выработку цитокинов, поляризующих Т-хелперы, антител и активированных Т-клеток. Напротив, вакцины с адьювантами способствуют созреванию большего количества антиген-презентирующих клеток, усиливают взаимодействие между ними и Т-клетками, способствуют выработке большего количества разнообразных цитокинов и большего количества многофункциональных Т-клеток и антител. Это приводит к

широкому и длительному иммунитету, а также к возможности использовать в вакцинах меньших доз антигена.

Адьюванты направляют и усиливают специфические адаптивные иммунные реакции, воздействуя на клетки врожденного иммунитета и активируя сигнальные пути, идущие от рецепторов распознавания образов (паттерн-распознающих рецепторов). Они также усиливают адаптивные иммунные реакции за счет имитации размера или пространственной структуры естественных патогенов. Результатом служит более эффективная презентация антигена антигенпредставляющими клетками, повышающая адаптивный иммунитет за счет активации клеток врожденного иммунитета [4]. Основной молекулярный механизм действия адьювантов заключается в том, что они путем активации антиген-презентирующих клеток способствуют генерации сигналов трех типов. Сигнала, возникающего при распознавании лимфоцитами презентируемого антигена (сигнал 1), костимулирующего сигнала, обеспечивающего повышенную жизнеспособность активируемых Т-лимфоцитов (сигнал 2) и сигнала, обеспечивающего через продукцию цитокинов дифференцировку активируемых клеток (сигнал 3).

Сигналами первого типа являются сигналы, рождающиеся при взаимодействии Т-клеточных рецепторов с антигенными пептидами, презентируемыми молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на мембране антиген-презентирующих клеток после захвата и процессинга антигена. Костимулирующие сигналы включаются через костимулирующие молекулы (CD40, CD80, CD86), экспрессирующиеся на поверхности антиген-презентирующих клеток. Сигналы третьего типа передаются провоспалительными цитокинами (например, IL-6, IL-10, IL-12 и TNF- $\alpha$ ). Индукция этих сигналов повышает активацию наивных Т-клеток, приводя к усилению адаптивного иммунного ответа [5]. В зависимости от механизмов действия адьюванты предложено классифицировать на

иммуностимуляторы и системы доставки. Иммуностимуляторы представляют собой молекулы, сигнализирующие об опасности. Они приводят к созреванию и активации антиген-презентирующих клеток, воздействуя на специфические рецепторы. В частности, иммуностимуляторы представляют собой патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP) или их имитаторы, которые взаимодействуют с паттерн-распознающими рецепторами на антиген-презентирующих клетках, вызывая врожденный иммунный ответ и приводя к активации и созреванию антиген-презентирующих клеток. Созревание антиген-презентирующих клетки приводит к снижению их фагоцитарной активности, но повышению способности презентировать антигены, способности экспрессировать высокие уровни костимулирующих молекул и продуцировать высокие уровни цитокинов. Описанные изменения приводят к инициации и усилению адаптивных иммунных реакций. Кроме того, разные типы иммуностимуляторов передают сигналы через разные паттерн-распознающие рецепторы, что приводит к секреции разных цитокинов, определяющих направленность адаптивных иммунных реакций [6]. Первоначально было обнаружено, что иммуностимуляторы проявляют свои эффекты, взаимодействуя с Толл-лайк рецепторами (TLR) на антиген-презентирующих клетках. Агонисты TLR, используемые в качестве адьювантов, показали многообещающие результаты, активируя TLR, повышая презентацию антигена, костимулирующие сигналы и продукцию цитокинов, что, в конечном итоге, приводит к усилению адаптивных иммунных реакций. Разные типы иммуностимуляторов вызывают различные по характеру адаптивные реакции через передачу сигналов различными TLR. Поскольку такие Толл-лайк-рецепторы как TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR6 экспрессируются на поверхности клеток, они в основном распознают компоненты микробных мембран, в частности их липиды, белки и липопротеины. Активация TLR на поверхности антиген-презентирующих клеток соответствующими иммуностимуляторами обычно приводит к

выработке провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6. В конечном итоге это приводит к выработке иммунного ответа Th1-типа и Th2 типа [7].

Толл-лайк рецепторы TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 являются внутриклеточными рецепторами. Они экспрессируются на мембране внутриклеточных везикул и реагируют с нуклеиновыми кислотами. Активация внутриклеточных TLR соответствующими типами иммуностимуляторов приводит к выработке интерферонов I типа. Интерфероны I типа направляют дифференцировку созревающих наивных Т-клеток в сторону Th1-клеток и регулируют их функцию. Кроме того, интерфероны I типа способствуют перекрестной презентации антигена CD8<sup>+</sup> Т-клеткам через дендритные клетки и могут напрямую стимулировать пролиферацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток [8].

Молекулярные механизмы действия иммуностимуляторов выглядят следующим образом:

- Иммуностимуляторы, связывающиеся с гетеродимерами TLR2/1 или TLR2/6, инициируют передачу сигналов по MyD88-зависимому пути и активируют транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B. Тем самым, они индуцируют выработку провоспалительных цитокинов, таких как IL12. IL-12 участвует в дифференцировке наивных Т-клеток в клетки Th1. С другой стороны, иммуностимуляторы, взаимодействующие только с TLR2, усиливают передачу внутриклеточных сигналов через киназу ERK1/2, что приводит к повышению экспрессии белка c-Fos, который подавляет экспрессию IL-12 и усиливает экспрессию IL-10. Это вызывает поляризацию наивных Т-клеток в клетки Th2-типа. То есть, иммуностимуляторы, нацеленные только на TLR2, индуцируют адаптивные иммунные реакции Th2-типа [9].

- Иммуностимуляторы, связывающиеся с TLR3, инициируют передачу сигналов через цитоплазматические адаптеры TRIF и IRF3. Они стимулируют антиген-презентирующие клетки к выработке интерферонов типа I. В конечном итоге это приводит к ответу Th1-типа и выработке цитотоксических Т-лимфоцитов.

- Иммуностимуляторы, связывающиеся с TLR4 и TLR5, инициируют передачу сигналов по MyD88-зависимому пути, активируя NF-κB. Последний индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов и вызывает поляризацию наивных Т-клеток в клетки Th1-типа. Иммуностимуляторы, запускающие адаптивный иммунитет через TLR4, также могут передавать сигналы через TRIF, приводя к активации IRF3 и вызывая выработку небольших количеств интерферонов типа I [10].

- Иммуностимуляторы, нацеленные на TLR7/8/9, расположенные в эндосомах антиген-презентирующих клеток, активируют NF-κB и регуляторный фактор интерферона 7 (IRF7) по MyD88-зависимому пути, запускают выработку провоспалительных цитокинов и интерферона I типа. Интерфероны, вырабатываемые антиген-презентирующими клетками, и индуцируют сильные реакции Th1-типа и активность цитотоксических CD8-положительных клеток.

В координации врожденного и адаптивного иммунитета важную роль отводят пути передачи сигналов, обозначаемого как cGAS-STING (циклическая гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфатсинтаза-стимулятор генов интерферона (cGAS-STING) [11]. cGAS представляет собой цитоплазматический ДНК-рецептор, который может быть активирован двухцепочечной ДНК. cGAS при активации превращают цитоплазматический аденозинмонофосфат и гуанозинмонофосфат в циклический гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат (cGAMP) [12]. Затем cGAMP

блокируется в V-образном связывающем кармане димера STING, вызывая конформационные изменения, агрегацию и активацию STING. После этого активируются NF- $\kappa$ B и IRF3, что, в свою очередь, способствует выработке провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа [13]. Интерфероны типа I, такие как IFN- $\alpha/\beta$ , индуцируют созревание антиген-презентирующих клеток, усиливают костимулирующие сигналы, способность к презентации и перекрестной презентации антигена [14].

Иммуностимуляторы, нацеленные на путь cGAS-STING, не только поляризуют наивные T-клетки в клетки Th1-типа, но и способствуют выработке цитотоксических T-клеток. К иммуностимуляторам, нацеленным на CGA-STING, относятся нуклеотидные низкомолекулярные агонисты и ненуклеотидные низкомолекулярные агонисты. Нуклеотидные низкомолекулярные агонисты включают циклический димерный гуанозинмонофосфат (c-di-GMP), циклический димерный аденозинмонофосфат (c-di-AMP), 2',3'-cGAMP и 3',3'-cGAMP [11]. Примерами ненуклеотидных низкомолекулярных агонистов являются DMXAA и CF501. Следует отметить, что митохондриальная ДНК (мтДНК) в цитоплазме также может активировать путь с участием STING [15].

Лектиновые рецепторы C-типа (CLR) представляют собой суперсемейство, включающее Dectin-1, Dectin-2, MINCLE, DC-SIGN, CD206, CD205 и другие белки. CLR в основном локализованы на клеточных мембранах и функционируют как паттерн-распознающие рецепторы [16]. Активируют CLR иммуностимуляторы с углеводной структурой. Результатом является повышение эффективности адаптивного иммунного ответа.

Так, активация Dectin-1  $\beta$ -глюканом приводит к фосфорилированию Syk-киназы, которая, в свою очередь, активирует NF- $\kappa$ B, что приводит к выработке провоспалительных цитокинов IL12, IL-1 $\beta$ , IL6 и IL23. Тем самым

индуцируется дифференцировка наивных Т-клеток в клетки Th1 и Th17 [17]. Клетки Th типа 1 также индуцируют сильный цитотоксический ответ CD8-положительными клетками и переключение изотипа иммуноглобулинов в В-клетках на антитела подкласса IgG2a. Эффекторные клетки Th17 характеризуются продукцией IL-17, IL-17F и IL-22 и запускают массивную воспалительную реакцию путем рекрутирования нейтрофилов [18].

Активация иммуностимуляторами рецепторов DC-SIGN, Dectin-2 и MINCLE также может приводить к активации NF-κB и продукции провоспалительных цитокинов. Однако, Dectin-2 и MINCLE не обладают мотивами активации ITAM. Способность к передаче внутриклеточного сигнала они приобретают только при ассоциации на мембране с FcRγ, который несет консенсную последовательность ITAM [19]. В связи с этим стимуляция DEC-205 и CD206 полисахаридными лигандами обычно приводит к усилению фагоцитоза и презентации антигена, но не к передаче внутриклеточного активационного сигнала.

Имуностимуляторы могут также активировать ряд других паттерн-распознающих рецепторов, таких как NOD1, NOD2, NLRP3, RIG-I и MDA5. Рецепторы NOD1, NOD2 и NLRP3 являются членами семейства NOD-подобных рецепторов (NLRs) [20]. Активация их адьювантами вызывает усиление экспрессии молекул гистосовместимости II класса и повышение эффективности презентации антигена. Активация этих рецепторов приводит к выработке провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β и IL-18. Они смещают поляризацию Т-клеток в клетки Th2-типа. Мурамилдипептид (MDP) или полный адьювант Фрейнда (CFA) могут активировать NOD1 и NOD2, NF-κB с образованием предшественников IL1, IL18 и IL33. Активация NLRP3 приводит к расщеплению этих факторов каспазами до их активных форм и генерации преимущественно Th2-типа иммунного ответа [21].

RIG-I и MDA5 являются членами семейства I-подобных рецепторов, индуцируемых ретиноевой кислотой, которые в основном распознают РНК. Большинство агонистов TLR3, таких как poly-I:C, также активируют MDA5. Активация RIG-I и MDA5 приводит к активации IRF3 и IRF7, которые, в свою очередь, индуцируют экспрессию интерферонов I типа [22]. Таким образом, иммуностимуляторы, нацеленные на эти два рецептора, в конечном итоге приводят к продукции Th1-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов.

Другая группа адъювантов, обозначаемая как системы доставки, определяются как материалы-носители, которые загружают антигены и увеличивают поглощение и презентацию антигенов антиген-презентирующими клетками. Другими словами, основная функция системы доставки заключается в облегчении презентации антигена. Процесс презентации антигена включает, как известно, распознавание, поглощение и процессинг антигенов антиген-презентирующими клетками с последующей загрузкой их на молекулы гистосовместимости и представлением на поверхности клеток с помощью молекул гистосовместимости [23]. Системы доставки могут усиливать сигналы антигена клеткам иммунной системы несколькими способами.

Системы доставки обеспечивают продление биодоступности антигенов за счет: а) обеспечения длительного высвобождения антигенов, б) формирования иммунных ниш и в) обеспечения защиты антигенов. Пролонгированная биодоступность антигенов обеспечивает поступление достаточного количества антигенов, доступных для антиген-презентирующих клеток. Соответственно, это приводит к увеличению выработки активационных сигналов от презентуемых пептидных антигенов. Системы доставки могут продлевать биодоступность антигенов в иммунной системе за счет медленного, постоянного и устойчивого высвобождения антигенов [24]. Примерами являются наноэмульсии MF59, AS03 и гидрогели [25].

Медленное высвобождение облегчает В-клеткам зародышевого центра многократный отбор клеток по аффинности, что в конечном итоге приводит к выработке больших количеств высокоаффинных антител [26]. Скорость высвобождения компонентов вакцины из гидрогеля можно регулировать, регулируя размер сетки гидрогеля и тем самым время высвобождения. Показано, что твердые полимерные частицы, изготовленные из полиангидридных полимеров, могут высвобождать субъединичные антигены в течение месяцев [27].

Некоторые системы доставки могут вызывать активацию иммунной системы за счет формирования депо антигена (иммунной ниши) в месте инъекции. Системы доставки, которые функционируют таким образом, не только продлевают время удержания антигенов, но и привлекают больше иммунных клеток в место инъекции. Проникновение клеток врожденного иммунитета в место инъекции позволяет нишеобразующим материалам для доставки обладать большей способностью к активации иммунитета. В систему доставки могут быть включены также медленно высвобождаемые цитокины. Наиболее часто используемым цитокином является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Кроме того, инкапсуляция некоторых иммуностимуляторов, таких как агонисты TLR, также может способствовать привлечению и инфильтрации клеток врожденного иммунитета [28]. Например, стержень из мезопористого кремнезема представляет собой самоадьювантный материал для доставки, который может активировать врожденный иммунитет через NLRP3 [29]. Более того, системы доставки могут продлевать биодоступность антигенов, защищая их (особенно ДНК и мРНК) от расщепления ферментами в организме. Таким образом, они поддерживают их биологическую активность.

Например, мРНК, кодирующие какие-либо антигены чувствительны к деградации ферментами во внеклеточной среде. Следовательно, их

необходимо инкапсулировать в герметичный носитель, чтобы избежать ферментативного гидролиза и обеспечить бесперебойную доставку мРНК к клеткам-мишеням. LNPs представляют собой своего рода проверенную эффективную систему доставки мРНК, и одной из их основных функций является инкапсуляция мРНК и защита ее от ферментов, разлагающих РНК [30]. Замедленное высвобождение антигенов путем образования “депо антигенов” для продления срока хранения и биодоступности антигенов считается ключевым механизмом действия адъювантов на основе гидроокиси алюминия. Однако показано, что удаление “депо антигена” после введения такого адъюванта существенно не снижало выработку антигенспецифического ответа Т- и В-клеток [31].

Системы доставки могут способствовать поглощению антигенов антиген-презентирующими клетками путем имитации размеров и пространственной структуры патогенов. Поскольку вирусы и бактерии представляют собой частицы нано- или микронного размера, иммунная система эволюционировала, чтобы распознавать наночастицы антигенов и реагировать на них. Для более эффективной доставки антигенов используются материалы, увеличивающие размеры антигенов и тем самым улучшающие их поглощение антиген-презентирующими клетками. Так, инкапсуляция антигенов в липосомные наночастицы улучшает распознавание и эндоцитоз антигенов по сравнению с растворимыми антигенами. Это приводит к усилению презентации антигена и индукции антител более высокой аффинности [32].

Патогенам присущи высокоупорядоченные и повторяющиеся пространственные структуры. Иммунная система эволюционно адаптировалась к распознаванию таких структур и реагированию на их присутствие. Самособирающиеся белковые наночастицы и другие системы доставки поливалентных частиц имитируют высокоупорядоченную и повторяющуюся пространственную структуру патогенов, увеличивая

вероятность поглощения антигена антиген-презентирующими клетками [33]. Обнаружено, что эти системы доставки вызывают сильные гуморальные и клеточные иммунные реакции в отсутствие иммуностимуляторов. Высокоупорядоченная и повторяющаяся пространственная структура систем доставки способствует агрегации В-клеточных рецепторов на мембране В-клеток, что приводит к более эффективной активации В-клеток и, в конечном итоге, к выработке высокоаффинных антител и В-клеток памяти [34].

Кроме того, системы доставки способствуют более эффективному поглощению антигена, если они взаимодействуют со специфическими рецепторами на поверхности антиген-презентирующих клеток. Примером могут служить системы доставки, способные специфически взаимодействовать с Fc-рецепторами или лектиновыми рецепторами на мембране антиген-презентирующих клеток. Показано, что системы доставки, включающие в свой состав компоненты, взаимодействующие с Fc-рецепторами, могут избирательно усиливать поглощение антигена и клеточный иммунитет *in vitro* и *in vivo* [35]. Кроме того, использование для модификации системы доставки углеводных лигандов таких рецепторов (рецептор маннозы, DEC-205, DC-SIGN), приводит к более прямому нацеливанию антигенов на конкретные дендритные клетки, тем самым усиливая поглощение антигена. Например, модифицированные маннозой полимеры для доставки антигенных пептидов меланомы эффективно индуцируют профилактические и терапевтические противоопухолевые иммунные реакции на моделях меланомы [36].

Известно, что большое количество клеток врожденного иммунитета локализуется в лимфоидных органах, которые являются местом инициации адаптивного иммунного ответа. Вследствие этого лимфоузлы являются ключевой мишенью для систем доставки, которые поставляют сюда антиген

путем пассивной диффузии. Важную роль здесь может играть заряд, гидрофобность, размер частиц систем доставки. Так, оптимальный размер составляет 5-100 нм, оптимальным суммарным зарядом является суммарный отрицательный заряд; к большему накоплению частиц приводит их повышенная гидрофильность за счет модификации полиэтиленгликолем [37].

Разработано несколько систем доставки для обеспечения перекрестной презентации антигена путем облегчения выхода антигенов из эндосомы или лизосомы, которые затем загружаются молекулами гистосовместимости I класса, обеспечивая таким образом перекрестную презентацию антигена. Эти системы доставки достигают своей цели тремя основными способами. Первая система работает по принципу так называемого эффекта протонной губки. Некоторые катионные полимеры или системы доставки липидов с протонсодержащими аминогруппами интернализуются антиген-презентирующими клетками и поглощают большое количество протонов для буферизации кислой среды эндосомы или лизосомы [38]. Это приводит к большому притоку ионов хлора и потоку воды из цитоплазмы в эндосому или лизосому, вызывая набухание и разрыв эндосомы. Процесс приводит к высвобождению антигенов в цитоплазму, облегчая перекрестную презентацию антигенов молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса. Например, в кислых условиях эндосомы полиэтиленминин поглощает протоны через свои протонообразующие аминогруппы, что приводит к набуханию и разрыву эндосомы. Модификация наночастиц гидроксида алюминия полиэтиленмином значительно увеличивает перекрестную презентацию антигена. Другие поликатионные полимеры и катионные липосомы усиливают перекрестную презентацию антигена за счет эффекта протонной губки [39]. Во-вторых, некоторые системы доставки дестабилизируют эндосомальные/лизосомальные мембраны путем слияния или связывания с ними, тем самым высвобождая антигены в цитоплазму и обеспечивая их перекрестную презентацию CD8<sup>+</sup> Т-клеткам [40].

Третья система доставки основана на методе высвобождения с фотохимической интернализацией [41]. Это новая технология доставки эндоцитозированного материала в цитозоль, основанная на вызванном светом разрушении мембран эндосом с использованием фотосенсибилизаторов. В частности, фотосенсибилизаторы включаются в системы доставки для совместной доставки антигенов, а затем фотосенсибилизаторы возбуждаются с образованием синглетного кислорода после воздействия определенного источника света, что вызывает перекисное окисление липидов и разрушение клеток, приводящие к высвобождению антигенов в цитоплазму и усилению иммунных реакций, опосредуемых CD8<sup>+</sup> Т-клетками [42].

Широко известными небелковыми адъювантами, используемыми в лицензированных вакцинах, являются адъюванты на основе алюминия: гидроксид алюминия и фосфат алюминия. Алюминий-содержащие адъюванты усиливают выработку антител IgG1 и IgE, стимулируя клеточный ответ Th2. Однако механизмы действия алюминиевых адъювантов сложны, и в настоящее время хорошо известны два аспекта их действия. Во-первых, адъюванты алюминия выступают в качестве системы доставки, которая тесно связывается с антигенами и устойчиво высвобождает антигены, тем самым продлевая биодоступность антигена и увеличивая сроки его презентации [43]. Во-вторых, адъюванты на основе алюминия индуцируют выработку DAMP. Тем самым активируются паттерн-распознающие рецепторы клеток врожденного иммунитета, что приводит к выработке цитокинов, таких как IL-1 $\beta$  и индуцируются иммунные реакции Th2-типа. Показано, что ДНК хозяина или мочевая кислота, высвобождающиеся в результате гибели клеток хозяина, вызванной адъювантом алюминия в месте инъекции, действуют как эндогенные сигналы опасности. Эти эндогенные сигналы опасности могут действовать как факторы, индуцирующие активацию путей врожденного иммунитета [44]. Что касается рецепторов, распознающих алюминиевые адъюванты, то предполагается, что это NLRP3 [45]. Адъюванты на основе

алюминия служат адьювантами выбора в вакцинной промышленности из-за их широкопризнанной безопасности и надежности. Алюминий-содержащие адьюванты широко используются в составе вакцин для профилактики различных инфекционных заболеваний, включая дифтерию, столбняк, менингит и вирус гепатита В. Однако адьюванты, содержащие алюминий, также имеют некоторые недостатки, включая трудности с индукцией сильного клеточного иммунного ответа и возможность побочных реакций (эритема, аллергические реакции) [46].

К эмульсионным адьювантам относят адьюванты с коммерческим названием MF59 и AS03. Они являются классическими адьювантами на основе эмульсии масло-в-воде. MF59 состоит из сквалена, Твина 80 и Спана 85 [47]. Эмульсия MF59 выполняет двойную функцию доставки антигена и иммуностимуляции. MF59 может использоваться в качестве системы доставки эмульсии, которая при совместной доставке с антигеном может пролонгировать взаимодействие антигена с иммунной системой и усилить презентацию антигена за счет медленного высвобождения антигенов в лимфатических узлах [48]. Это приводит к тому, что на поверхность антиген-презентирующих клеток поступает больше антигенных сигналов, и, следовательно, организм вырабатывает более сильный специфический иммунный ответ против антигенов. Кроме того, MF59 также действует как иммуностимулятор. MF59 может нацеливаться на специфические рецепторы и активировать клетки врожденного иммунитета, индуцируя выработку эндогенных сигналов опасности. Введение MF59 в мышцы активирует клетки врожденного иммунитета, такие как макрофаги и дендритные клетки, и способствует выработке хемокинов (CCL2), CCL4, CCL5, CXCL8). Последние, в свою очередь, рекрутируют больше клеток врожденного иммунитета в место инъекции для дальнейшего усиления иммунных реакций и способствуют миграции рекрутированных клеток врожденного иммунитета в дренирующие лимфатические узлы для активации

В- и Т-клеток. Вакцинация адьювантом MF59 приводит к Th2-иммунному ответу и слабой индукции Th1-ответа [49]. AS03 - это еще один адьювант эмульсии масло-в-воде, который состоит из альфа-токоферола, скваленса и Твина 80. Адьювантные эффекты AS03 и MF59 схожи. Во-первых, он выполняет функцию системы доставки антигена для усиления представления сигналов антигена на поверхности APC за счет медленного высвобождения. Во-вторых, AS03 также обладает иммуностимулирующим действием, поскольку он также содержит сквален. Альфа-токоферол участвует в регуляции экспрессии хемокинов и цитокинов, таких как CCL2, CCL3, интерлейкин 6 и CXCL1, которые усиливают поглощение антигенов и увеличивают количество клеток врожденного иммунитета, рекрутируемых в дренажные лимфатические узлы. Как и MF59, в целом, AS03 также в основном индуцирует Th2-зависимый иммунный ответ со слабой индукцией Th1-ответа [50].

Еще два классических адьюванта - AS04 и CpG ODN 1018 - являются адьювантами на основе молекул-агонистов Толл-лайк рецепторов (TLR). AS04 адсорбируют на алюминии и, в связи с этим, он также выполняет функцию иммуностимуляции и доставки антигенов. Однако иммуностимулирующая функция AS04 сильнее, чем у алюминиевого адьюванта. Это связано с тем, что AS04 содержит более мощную иммуностимулирующую молекулу, называемую монофосфориллипидом А. Она вызывает активацию транскрипционного фактора NK-кВ и продукцию провоспалительных цитокинов, что приводит к более сильному Th1-ответу и индуцирует более сбалансированный иммунный ответ Th1/Th2. Адьювант AS04 в настоящее время используется в вакцине против вируса папилломы человека (Церварикс) [51]. Адьювант CpG ODN 1018 представляет собой синтетическую одноцепочечную молекулу ДНК, которая является агонистом TLR. CpG ODN 1018 специфически активирует TLR9, что приводит к активации транскрипционного фактора TRF7, что вызывает выработку

провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа и, в конечном итоге, к сильному клеточному ответу Th1-типа с выработкой цитотоксических Т-клеток [52].

В качестве адъювантов используют липидные наночастицы. Они состоят из ионизируемых липидов, фосфолипидов, холестерина и липидов, модифицированных полиэтиленгликолем [53]. Основными компонентами липидных наночастиц являются ионизируемые липиды. Фосфолипиды и холестерин способствуют структурной целостности липидных наночастиц, а модификация полиэтиленгликолем помогает поддерживать стабильность липидных наночастиц. Механизмы действия липидных наночастиц в основном включают (1) обеспечение эффективной защиты антигенов и продление их биодоступности; (2) увеличение размера частиц антигенов для нацеливания на антиген-презентирующие клетки и стимуляция их поглощения; (3) стимуляция выхода антигена из эндосом путем слияния мембран, что приводит к ответу CD8<sup>+</sup> Т-клеток [54]. Липидные наночастицы усиливают гуморальный иммунный ответ на вакцины на основе мРНК и белковых субъединиц, индуцируя пролиферацию Т-фолликулярных хелперных клеток, В-клеток зародышевого центра, долгоживущих плазматических клеток и В-клеток памяти [55]. В последние годы липидные наночастицы были применены в качестве системы доставки вакцин на основе мРНК против COVID-19. Начиная с 2020 года вакцина Pfizer BNT162b2 (известная как Comirnaty) и вакцина Moderna с мРНК-1273 (известная как Spikevax) с липидными наночастицами для доставки мРНК внесли значительный вклад в борьбу с COVID-19 [56].

Адъювантными свойствами обладает также ряд натуральных и синтетических полимеров. Обычно механизм, с помощью которого они работают, заключается в медленном высвобождении антигенов. Наиболее распространенным природным полимером, используемым в вакцинах,

является хитозан. Хитозан является поликатионом и обладает биоадгезивными свойствами. Он может образовывать комплекс с нуклеиновой кислотой через электростатические взаимодействия. Кроме того, биоадгезивные свойства хитозана позволяют ему оставаться в контакте с поверхностями слизистых оболочек в течение длительного времени, вызывая непрерывную стимуляцию иммунных клеток антигенами. Это указывает на то, что хитозан может быть многообещающей системой доставки вакцин на основе нуклеиновых кислот и вакцин для слизистых оболочек. Обнаружено, что хитозан, наряду с индукцией антителопродукции, стимулирует выработку интерферонов I типа путем активации Т-клеточного иммунитета [57-59]. Частицы синтетических полимеров обычно обладают более высокой воспроизводимостью и более контролируемой скоростью высвобождения антигена, чем натуральные полимеры. Примером могут служить биоразлагаемые синтетические полимерные частицы, построенные из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). Они эффективно увеличивают поглощение и презентацию антигена дендритными клетками. Разработана частица PLGA, которая инкапсулирует антигены и адъюванты из двунитевой RNA. Было показано, что вакцина с такими частицами демонстрирует идеальную кривую высвобождения антигена, эффективно фагоцитируется и вырабатывает эффективный и длительный иммунный ответ [60].

Полиоксидоний (азоксимера бромид) – широко известный отечественный иммуномодулятор – является сополимером N-оксида 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния бромида. Он обладает иммуностимулирующим, дезинтоксикационным, антиоксидантным, а также умеренным противовоспалительным действием. Используется в составе противогриппозной вакцины «Гриппол» (Гриппол Плюс, Гриппол Квадривалент [61]. Повышает функциональную активность клеток фагоцитарной системы, воздействует на кислородонезависимые механизмы

бактерицидности лейкоцитов, активируя фактор NF- $\kappa$ B, регулирующий синтез цитокинов, ответственных за выживаемость клеток [62].

Синтетические двухцепочечные РНК (dsRNA) способны выполнять адьювантную функцию, активируя рецепторы TLR3 и MDA5 на антиген-презентирующих клетках, что приводит к выработке провоспалительных цитокинов, таких как IL-12 и интерфероны типа I. Они помогают выработке сильного иммунного ответа, зависящего от Th1-клеток и цитотоксических T-клеток. Поли-I:C и его модифицированный вариант поли-ICLC являются наиболее изученными синтетическими иммуностимуляторами двухцепочечных РНК [63]. *In vitro* поли-I:C и поли-ICLC индуцируют созревание дендритных клеток, происходящих из моноцитов периферической крови человека. Это приводит к секреции IFN- $\beta$  и провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-12, перекрестной презентации экзогенных антигенов CD8<sup>+</sup> T-клетками и запускает Th1-поляризованный иммунный ответ. Как доклинические, так и клинические исследования показали, что поли-I: C и поли-ICLC являются многообещающими адьювантами, которые усиливают выработку антител и иммунный ответ CD8<sup>+</sup> T-клетками. Однако, поли-I: C / поли-ICLC могут иметь побочные эффекты, такие как дозозависимая системная лихорадка и нарушения свертываемости крови [64, 65].

Циклические динуклеотиды, которые также используют в качестве адьювантов, активируют путь cGAS-STING, приводя к активации транскрипционных факторов IRF3 и NF- $\kappa$ B, индукции выработки интерферонов типа I и провоспалительных цитокинов [66]. Интерфероны I типа избирательно стимулируют перекрестную презентацию антигена и мобилизуют CD8<sup>+</sup> T-клетки. В результате циклические динуклеотиды генерируют сильные клеточные реакции Th1-типа и ответ цитотоксических T-клеток. Природные циклические динуклеотиды включают 2', 3'-cGAMP, 3', 3'-cGAMP, c-di-GMP и c-di-AMP, которые являются вторичными

мессенджерами бактерий и млекопитающих с сильными иммуномодулирующими функциями. Инкапсулированный в липосомы 2',3'-cGAMP усиливает гуморальные и CD8<sup>+</sup> Т-клеточные реакции и индуцирует долгосрочные протекторные иммунные реакции [67, 68]. Минусом природных циклических динуклеотидов является короткий период полураспада и низкая эффективность их поглощения. В связи с этим появились синтетические циклические динуклеотиды с химическими модификациями для усиления их иммунных эффектов (ADU-S100, МК-1454, BMS-986301). Однако конкретных примеров использования этих синтетических циклических динуклеотидов в качестве адъювантов для вакцин нет.

Обнаружено, что марганец и его производные обладают потенциальной адъювантной активностью. Они индуцируют выработку интерферонов I типа, усиливают презентацию антигена и перекрестную презентацию, способствуя выработке антител и повышению эффективности цитотоксического звена адаптивного иммунитета [69]. Сообщается, что Mn<sup>2+</sup> индуцирует выработку дендритными клетками костного мозга мышей большого количества IFN $\beta$  и IFN $\alpha$  и приводит к значительному усилению экспрессии костимулирующих молекул (CD80 и CD86) и хемокинов (CCL2 и CCL3). Минусом является способность Mn<sup>2+</sup> к агрегации, приводящая к потере адъювантной активности. Чтобы предотвратить агрегацию Mn<sup>2+</sup> в растворе и потерю адъювантной активности, разработана серия наноадъювантов, содержащих ионы Mn<sup>2+</sup> [70]. Наноразмерное марганцевое желе (MnJ), которое не только обладает способностью активировать путь cGAS-STING в качестве иммуностимулятора, индуцирующего выработку интерферонов типа I, но также служит системой доставки антигена [71]. При введении интраназально MnJ действует как адъювант для слизистой оболочки, индуцируя высокий уровень IgA-антител. Вакцина против коронавируса с nanoMn в качестве адъюванта индуцировала сильный ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток и показала хорошую безопасность *in vivo*. Кроме того, некоторые другие наноадъюванты на основе

Mn<sup>2+</sup> также продемонстрировали эффект активации пути cGAS-STING и улучшения иммунных реакций на вакцины [72, 73]. Это свидетельствует о том, что марганец обладает большим потенциалом в качестве мишени для разработки новых адъювантов для вакцин.

Для создания обладающих адъювантными свойствами иммуногенов, имитирующих упорядоченные, схожие с природными структуры, используются белковые молекулы, способные к самосборке в крупные регулярные образования [74-75]. Получение самособирающихся структур, несущих необходимые эпитопы антигенов, используется в настоящее время для создания индивидуальных дизайнерских наноразмерных вакцин, в которых учитывается природный дизайн антигенов [76-78].

При разработке таких вакцин широко используется белок ферритин [79]. Ферритин имеется у многих живых организмов, включая бактерии, грибы, растения и животных [80]. Его основная физиологическая функция заключается в хранении железа в нетоксичной форме и обеспечении его биодоступности для клетки путем преобразования в растворимую форму [81]. Он также обеспечивает защитный эффект против токсического воздействия избытка свободного железа, приводящего к генерации реактивных форм кислорода, которые могут нарушать жизнедеятельность клеток и приводить к их гибели [82].

Ферритин является перспективной платформой для презентации антигенов клеткам иммунной системы [83]. Помимо способности к самосборке, белковый комплекс ферритина обладает экстраординарной термической (выдерживает температуры до 80-100°C) и pH-стабильностью (диапазон pH 3-10), монодисперсностью, небольшим однородным размером, биосовместимостью, биоразлагаемостью, дешевой крупномасштабного производства, полыми полостями при сборке и способностью к декорированию поверхности с помощью генно-инженерных подходов [84-85].

С тех пор как Li и др. [83] впервые функционализировали внешнюю поверхность ферритина пептидом Tat ВИЧ-1, многие другие исследования использовали ферритин в качестве системы доставки антигена. Несколько антигенов, состоящих из отдельных коротких пептидов или сложных белков, были успешно экспрессированы совместно с ферритином и использованы для создания наночастиц, служащих основой создаваемых вакцин [86-87]. Помимо разработки вакцин, ферритин используется в нанобиотехнологии для доставки лекарств, биомиметического синтеза, биовизуализации и клеточного таргетинга [88-91].

Еще один белок, обладающий адьювантными свойствами и собирающийся в крупные регулярные структуры, – это флагеллин. Многие бактерии имеют один или несколько жгутиков, которые отвечают за подвижность бактерий, а также функционируют как сенсоры окружающей среды [92-93]. Жгутики бактерий состоят из трех субструктур: базального тела, крючка и спиральной нити [94]. Базальное тело является мотором, обеспечивающим вращение жгутика, и прикрепляет его к клеточной мембране. Нить представляет собой длинную, полую спиралевидную трубку, которая вращается, передавая энергию для поступательного движения бактериальной клетки. Связывает эти два компонента вместе крючок, который функционирует как гибкий шарнир для передачи крутящего момента от базального тела к нити. Строительными блоками жгутиковой нити являются мономерные молекулы белка флагеллина, которые путем самосборки образуют нить жгутика. Каждый мономер флагеллина состоит из четырех глобулярных доменов (D0-D3) [95]. Из них домены D0 и D1 консервативны, в то время как домены D2 и D3 изменчивы по строению и длине полипептидной цепи у разных видов бактерий. Для флагеллина показана способность формировать нанотрубки. Как мономерный, так и организованный в наноструктуры флагеллин представляет собой патоген-ассоциированную молекулярную структуру, которая является лигандом для Toll-подобного рецептора 5 (TLR5) [96, 97]. Кроме того, показано связывание флагеллина с представителями членов семейства Nod-

подобных рецепторов (NLR): Nlrc4 и Naip5 [98, 99]. Известно, что флагеллин взаимодействует с TLR5 рецептором как N-концевым доменом D1 [100], так и C-терминальной областью белка [101]. Связывание флагеллина с рецепторами Naip5 и Nlrc4 происходит за счет 35 C-концевых аминокислот домена D0, после чего происходит транслокация флагеллина в цитозоль [102]. Благодаря связыванию с рецепторами флагеллин способен инициировать врожденные и адаптивные иммунные реакции через множество путей, стимулируя как гуморальный, так и клеточный иммунитет [37].

К настоящему времени опубликовано множество работ по использованию флагеллина в качестве адъюванта при разработке вакцин. В большинстве исследований использовались флагеллины *Salmonella typhimurium* fliC (STF1) или fljB (STF2) либо в виде смеси с антигеном, либо в виде слитых белков [103]. Генетическое слияние антигенов с C- или N-концом флагеллина или химическая конъюгация [104] обеспечивали развитие более сильного иммунного ответа, в сравнении с использованием простой смеси флагеллина с антигеном [105]. Интересно отметить, что слияние антигена с флагеллином в большинстве случаев приводит к активации цитотоксических лимфоцитов. Выбор N- или C-концевого слияния может также влиять на уровень и тип иммунного ответа, вызываемого антигеном. Например, N-концевое слияние белка E7 вируса папилломы человека типа 16 (ВПЧ-16) с белком fliC *S. typhimurium* привело к 10-кратному увеличению стимуляции через TLR5 по сравнению с аналогичным C-концевым слиянием [106]. В то же время C-концевое слияние приводило к активации инфламмосомы через Nlrc4 и вызывало более высокие уровни E7-специфических цитотоксических лимфоцитов, которые эффективно подавляли рост опухолей в модели ВПЧ-16-ассоциированного рака у мышей. В сумме такие свойства флагеллина позволяют использовать его не только как носитель, но и как адъювант [18].

Несмотря на описанные выше преимущества, флагеллин высокого качества трудно получить из-за его быстрой протеолитической деградации (особенно C-концевого домена), загрязнений эндотоксинами,

иммуномодулирующими нуклеотидами и его склонности к полимеризации [107]. Кроме того, введение флагеллина приводит к выработке антител против него самого, что подавляет его иммуностимулирующую активность при использовании в качестве адъюванта при многократных введениях вакцины. Для преодоления этих проблем были предприняты попытки создать измененные формы флагеллина (например, путем включения различных мутаций [108], уменьшения размера белка [109] или использования только небольших пептидов, которые сохраняют иммуностимулирующую способность и не влияют на его фармацевтические свойства [110]).

Предприняты попытки использовать в качестве вакцины различные антигены, слитые с флагеллином. К ним относятся вакцины против заболеваний, вызванных *Campylobacter* [111], широкий спектр вакцин против вируса гриппа А [112-113], ротавируса [114], *Yersinia pestis* [115] и *S. pneumonia* [116]. Однако использование флагеллина имеет свои ограничения из-за его мощной иммуностимулирующей активности, включающей секрецию провоспалительных цитокинов, а также из-за его потенциальной роли в патогенезе воспалительных заболеваний сердечно-сосудистой системы [117], кишечника [118], печени [119], легких [120]. В связи со способностью флагеллина стимулировать системный цитокиновый шторм, а также вызывать сильные воспалительные реакции в месте введения высказываются опасения по поводу безопасности его использования в качестве адъюванта в составе вакцин. В то же время данные клинических испытаний показали, что введение очень низких доз белков, слитых с флагеллином (1-10 мкг), сводят к минимуму возможность тяжелых последствий [37]. В целом, результаты клинических испытаний свидетельствуют о том, что большинство побочных эффектов, связанных с введением малых доз слитых с флагеллином белков, являются легкими (боль в месте инъекции, головная боль, усталость и миалгия) [112].

Бактериальные липопротеины представляют собой класс белков, связанных с клеточной стенкой. Они участвуют в клеточной адгезии, метаболизме компонентов клеточной стенки, устойчивости к антибиотикам, в

поглощении клеточной питательных веществ, фолдинге белков и передаче трансмембранных сигналов [121]. Зрелые бактериальные липопротеины имеют N-концевой остаток цистеина, который выполняет функцию крепления белков к мембранам бактериальных клеток. Бактериальные липопротеины распознаются хозяином как чужеродные, что приводит к стимуляции врожденного иммунитета через Toll-подобные рецепторы [122, 123]. Бактериальные липопротеины и их синтетические аналоги были предложены в качестве адъювантов для разработки субъединичных вакцин [124]. Показано, что бактериальные липопротеины обладают способностью усиливать антитело- и клеточно-опосредованный ответ на слитые с ними антигены, а также могут стимулировать мукозальный иммунитет после их попадания на слизистые поверхности (например, назальным или оральным путем) [125-128].

Слияние генов, кодирующих целые бактериальные липопротеины или их N-концевые фрагменты, с интересующими антигенами дает возможность, используя технологии экспрессии рекомбинантных белков, напрямую получать белковые вакцины со встроенным липопептидным адъювантом. Однако, несмотря на кажущуюся простоту этого подхода, его широкому применению препятствуют несколько проблем. Экспрессия бактериальных липопротеинов в *Escherichia coli* обычно связана с неполным или полным отсутствием липидирования, низким уровнем экспрессии, трудностями очистки рекомбинантного липопротеина от его нелипидированного предшественника или других бактериальных компонентов, а также получением гетерогенных продуктов, содержащих различные модификации липидов [129]. Тем не менее, проводятся доклинические испытания нескольких прототипов вакцин, в составе которых используются антигены, слитые с липополипротеинами [39].

Фибронектины - это группа гликопротеинов, которые в избытке присутствуют в плазме крови и внеклеточном матриксе, играют важную роль в клеточной адгезии, дифференцировке, росте и миграции клеток, необходимы для эмбриогенеза и включают функциональные домены, которые связываются

с различными молекулами, включая коллаген, фибрин, гепарин и интегрины [130]. Фибронектины состоят из двух мономеров 230-250 кДа, которые включают три типа повторяющихся единиц (FNI, FNII и FNIII) и сшиты через С-концевой участок дисульфидными связями, образуя димеры. Фибронектины кодируются одним геном, при этом у человека наблюдается до двадцати их различных вариантов. Они образуются путем альтернативного сплайсинга мРНК. Кроме того, экспрессируются два различных типа фибронектина. Это клеточный фибронектин, который содержится в тканевом внеклеточном матриксе, и растворимый плазменный фибронектин, который вырабатывается гепатоцитами и составляет большую часть фибронектина в плазме. Из них только клеточный фибронектин включает образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК последовательности, называемые EDA или EDB [131].

Интерес к использованию EDA в качестве адъюванта для противовирусных и противоопухолевых вакцин возник после обнаружения того, что EDA является эндогенным агонистом Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) [132]. Генетическое или химическое слияние антигенов с С- или N-концами EDA позволяло направлять их на TLR4-экспрессирующие дендритные клетки, стимулируя их созревание, активацию NF-κB пути и высвобождение провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-12 [133], что, в свою очередь, приводило к активации Т- и В-лимфоцитов [134].

Для понимания механизмов адъювантной активности EDA фрагмента фибронектина было изучено влияние удлинения его N- и С-концов на иммуностимулирующую активность. Было показано, что при удлинении N-конца EDA получается адъювант, который связывает TLR4 с эффективностью, сравнимой с липополисахаридом, но без сопутствующей токсичности. В сравнении с коротким EDA он вызывает также более высокую продукцию цитокинов NF-κB, TNF-α и IL-12 [135].

На сегодняшний день опубликовано ограниченное количество результатов исследований по использованию EDA в качестве адъюванта. Все

они были проведены на животных моделях, при этом данные клинических испытаний на людях в настоящее время не опубликованы. В качестве примеров можно привести работы по слитым белкам, в составе которых EDA связан с неструктурным белком NS3 вируса гепатита С [136] или основным структурным капсидным белком p24 ВИЧ-1 [137]. Известен также продукт слияния N- и C-концов EDA с остатками 1-29 и 43-98 белка E7 папилломавируса-16 и 18 [138]. Во всех трех работах продемонстрирована способность продуктов слияния использованных антигенов с EDA стимулировать клеточный и антительный иммунный ответ.

Белковыми адьювантами могут также выступать белки теплового шока (Hsp). Они образуют семейство белков, которые сверхэкспрессируются в ответ на стрессы, вызванные изменениями окружающей среды (например, повышенные температуры, экстремальные значения pH, осмотический стресс, УФ-облучение, воспаление, недостаток кислорода и питательных веществ) [139]. Hsp являются молекулярными шаперонами. Они принимают участие в поддержании гомеостаза клетки путем предотвращения агрегации белков, оказания им помощи при фолдинге (hsp40, hsp60, hsp70). Они участвуют в перестройке структуры белков с неправильным фолдингом (hsp100) и транспорте белков между клеточными компартментами, а также в протеасомной деградации белков (убиквитин, hsp104) [140]. Функционирование большинства Hsp критически необходимо для выживания клетки, а мутации генов Hsp во многих случаях приводят к летальному исходу. Кроме того, Hsp участвуют в различных сигнальных процессах, включая стимуляцию иммунного ответа через CD14, TLR2 и TLR4 [141].

Одними из первых доказательств того, что Hsp могут быть использованы для стимуляции адаптивного иммунного ответа на комплексные пептидные антигены, стали исследования, показавшие, что введение gp96, выделенного из клеток саркомы мыши, может способствовать отторжению той же опухоли, из которой был очищен gp96. Введение gp96, полученного из нормальных

тканей или других опухолей, не проявляло такого эффекта. Впоследствии было установлено, что защитные иммунные реакции вызываются не самим белком gp96, а связанными с ним пептидами самой опухоли [142].

Hsp активируют врожденный и адаптивный иммунитет благодаря своей способности связывать как полипептидные антигены, так и рецепторы антиген-презентирующих клеток [141]. Способность вызывать гуморальный и клеточный иммунный ответ продемонстрирована при нековалентной загрузке белковых антигенов в пептид-связывающие карманы Hsp и использовании антигенных пептидов, слитых с Hsp [143]. Иммуностимулирующая активность показана для hsp60/hsp65, hsp70, hsp90/gp96 и кальретикулина. При разработке вакцин наиболее интенсивно используется hsp70 [144]. Продемонстрировано, что он обладает мукозальной адьювантной активностью у мышей и людей при доставке интраназально [145] или интравагинально [146] генетически или ковалентно связанных с ним полипептидных антигенов.

Точные механизмы, с помощью которых Hsp стимулируют иммунитет к слитым или нековалентно связанным полипептидным антигенам, до конца не понятны. Однако известно, что Hsp обладают многими свойствами, которые способствуют этой активности. К ним относятся способность выступать в качестве сигнала опасности при высвобождении во внеклеточную среду в ответ на клеточный некроз [147] и взаимодействие с различными рецепторами (CD14, CD40, CD91, LOX-1, SR-A, SREC-1, TLR2 и TLR4), приводящее к стимуляции иммунного ответа и высвобождению цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-12 и хемокинов. Показана стимуляция созревания дендритных клеток и активация цитотоксических лимфоцитов путем поглощения антигенов, слитых с Hsp [39].

Потенциальной проблемой использования Hsp при разработке субъединичных вакцин является большой размер молекулы, а также необходимость правильного фолдинга Hsp. Это обуславливает необходимость получения белков теплового шока путем очистки из природных источников (например, из опухоли пациента) или получение с помощью методов генетической инженерии, использующих клетки эукариот. Генетическое

слияние крупных белковых антигенов из-за их размера может привести к их низкой экспрессии. Чтобы обойти эту проблему и создать слитые иммуногены на основе Hsp были идентифицированы небольшие полипептиды, использование которых позволило создавать упрощенные иммуногенные конструкции с низкой молекулярной массой и сохранением иммуномодулирующей активности [148-150].

Zhang Y. с коллегами недавно разработали оригинальный подход к конструированию иммуногена для противоопухолевой вакцины на основе белка Hsp 110. Действие иммуногена основывается на том, что белок теплового шока Hsp 110 может усиливать противоопухолевый эффект эпитопа, соответствующего 49-57 аминокислотам белка E7 вируса папилломы человека 16 (E7<sub>49-57</sub>). Для доставки иммуногена была использована способность синтетического пептида (ACRGDMFFCA-GGG-KKKKKKKKKKKKKKKKKKK) формировать положительно заряженные наночастицы, которые связывали отрицательно заряженный плазмидный вектор, кодирующий генетически слитый белок E7<sub>49-57</sub>-Hsp110. Вакцинация лабораторных мышей-носителей опухолевых клеток линии TC-1 показала, что наночастицы, направляемые пептидом ACRGDMFFCA, эффективно проникали в опухолевые клетки и экспрессировали слитый белок E7<sub>49-57</sub>-HSP110. Такой подход позволял подавлять рост опухоли и увеличивал продолжительность выживания мышей как в профилактической, так и терапевтической моделях вакцинации [151].

Вакцины с адъювантами Hsp были исследованы в различных моделях заболеваний животных, включая мышей и приматов, а некоторые прошли клинические испытания на людях. В основном Hsp были использованы для разработки терапевтических противораковых вакцин [151-155]. Также Hsp были применены в качестве адъювантов для вакцин, направленных против вируса простого герпеса-1 (HSV-2) [156], ВИЧ-1 [157], папилломавируса [158] и гриппа [159], возбудителей бактериальных инфекций (*Mycobacterium leprae*

[160] и туберкулеза [161]) и паразитарных (*Schistosomajaponicum* [162]) инфекций.

Кроме того, персонализированная вакцина на основе gp96 (HSPPC-96), известная как Vitespen или Oncophage (Agenus Inc) и основанная на использовании клеток собственной опухоли пациента, была одобрена для лечения неметастатической почечно-клеточной карциномы на ранней стадии в России с 2008 года [163]. Это первая из поступивших на рынок терапевтических вакцин против рака, которая хорошо переносится и не имеет серьезных побочных эффектов. Однако она оказалась малоэффективной на поздних стадиях заболевания. Кроме того, компания Agenus проводит клинические испытания нескольких других вакцин на основе Hsp. К ним относятся проходящие испытания II и III фазы персонализированные вакцины на основе gp96 для лечения глиобластомы [164] и меланомы [165]. Также проводится II фаза испытаний рекомбинантной вакцины на основе hsp70 против генитального герпеса (HerpV; AG-707). Вакцина включает 32 синтетических пептидных антигена простого герпеса-2 [166]. Компания AkelaPharma также провела испытания II фазы вакцины против вируса папилломы человека типа 16. В вакцине в качестве антигена используется сложный иммуноген, состоящий из белка E7 папилломавируса 16, слитого с пептидом *Mycobacteriumbovis* (BCG) и N-концевым фрагментом hsp65 [167]. Было продемонстрировано, что эта вакцина уменьшает количество анальных сквамозных интраэпителиальных поражений, аногенитальных бородавок [168], а также эффективна против рецидивирующего респираторного папилломатоза [169] и цервикальных интраэпителиальных неоплазий [170].

### Список литературы

1. Freund J., McDermott K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1942. – Vol. 49. – P. 548–553.

2. Iwasaki A., Omer S.B. Why and How Vaccines Work // *Cell*. – 2020. – Vol. 183, Suppl. 2. – P. 290-295.
3. O'Hagan D.T., Valiante N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2003. – Vol. 2, Suppl. 9. – P. 727-735.
4. Coffman R.L., Sher A., Seder R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work // *Immunity*. – 2010. – Vol. 33, Suppl. 4. – P. 492-503.
5. Pollard A.J., Bijker E.M. A guide to vaccinology: from basic principles to new development // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. – Vol. 21, Suppl. 2. – P. 83-100.
6. Turley J.L., Lavelle E.C. Resolving adjuvant mode of action to enhance vaccine efficacy // *Curr. Opin. Immunol.* – 2022. – Vol. 77. – P. 102229.
7. Luchner M., Reinke S., Milicic A. TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, Suppl. 2. – P. 142.
8. Desmet C.J., Ishii K.J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12, Suppl. 7. – P. 479-491.
9. Watford W.T., Moriguchi M., Morinobu A. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune response // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2003. – Vol. 14, Suppl. 5. – P. 361-368.
10. Hennessy E.J., Parker A.E., O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – Vol. 9, Suppl. 4. – P. 293-307.
11. Van Herck S., Feng B., Tang L. Delivery of STING agonists for adjuvanting subunit vaccines // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2021. – Vol. 179. – P. 114020.
12. Barnett K.C., Coronas-Serna J.M., Zhou W. et al. Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA // *Cell*. – 2019. – Vol. 176, Suppl. 6. – P. 1432-1446.

13. Wang Y., Luo J., Alu A. cGAS-STING pathway in cancer biotherapy // *Mol. Cancer.* – 2020. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. 136.
14. Diamond M.S., Kinder M., Matsushita H. et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208, Suppl. 10. – P. 1989-2003.
15. Liu S., Feng M., Guan W. Mitochondrial DNA sensing by STING signaling participates in inflammation, cancer and beyond // *Int. J. Cancer.* – 2016. – Vol. 139, Suppl. 4. – P. 736-741.
16. Lepenies B., Lee J., Sonkaria S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – Vol. 65, Suppl. 9. – P. 1271-1281.
17. Brown G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6, Suppl. 1. – P. 33-43.
18. Korn T., Bettelli E., Oukka M. et al. IL-17 and Th17 Cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 485-517.
19. Brubaker S.W., Bonham K.S., Zanoni I. et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective // *Annu. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 257-290.
20. Kvarnhammar A.M., Petterson T., Cardell L.O. NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in human eosinophils: activation by NOD1 and NOD2 agonists // *Immunology.* – 2011. – Vol. 134, Suppl. 3. – P. 314-325.
21. Liu T., Zhang L., Joo D. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation // *Annu Signal Transduct. Target Ther.* – 2017. – Vol. 2. – P. 17023.
22. Kasumba D.M., Grandvaux N. Therapeutic Targeting of RIG-I and MDA5 Might Not Lead to the Same Rome // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2019. – Vol. 40, Suppl. 2. – P. 116-127.
23. Roche P.A., Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15, Suppl. 4. – P. 203-216.

24. Roth G.A., Picece V.C.T.M., Ou B.S. et al. Designing spatial and temporal control of vaccine responses // *Nat. Rev. Mater.* – 2022. – Vol. 7, Suppl. 3. – P. 174-195.
25. Roth G.A., Gale E.C., Alcántara-Hernández M. et al. Injectable Hydrogels for Sustained Codelivery of Subunit Vaccines Enhance Humoral Immunity // *ACS Cent. Sci.* – 2020. – Vol. 6, Suppl. 10. – P. 1800-1812.
26. Lee J.H., Sutton H.J., Cottrell C.A. et al. Long-primed germinal centres with enduring affinity maturation and clonal migration // *Nature.* – 2022. – Vol. 609, Suppl. 7929. – P. 998-1004.
27. Yue H., Ma G. Polymeric micro/nanoparticles: Particle design and potential vaccine delivery applications migration // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33, Suppl. 44. – P. 5927-5936.
28. Roth G.A., Saouaf O.M., Smith A.A.A. et al. Prolonged Codelivery of Hemagglutinin and a TLR7/8 Agonist in a Supramolecular Polymer-Nanoparticle Hydrogel Enhances Potency and Breadth of Influenza Vaccination // *ACS Biomater Sci. Eng.* – 2021. – Vol. 7, Suppl. 5. – P. 1889-1899.
29. Li W.A., Lu B.Y., Gu L. The effect of surface modification of mesoporous silica micro-rod scaffold on immune cell activation and infiltration // *ACS Biomaterials.* – 2016. – Vol. 83. – P. 249-256.
30. Lorentzen C.L., Haanen J.B., Met Ö. et al. Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment // *Lancet Oncol.* – 2022. – Vol. 23, Suppl. 10. – P. e450-e458.
31. Hutchison S., Benson R.A., Gibson V.B. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity // *FASEB J.* – 2012– Vol. 26, Suppl. 3. – P. 1272-1279.
32. Tokatlian T., Kulp D.W., Mutafyan A.A. et al. Enhancing Humoral Responses Against HIV Envelope Trimers via Nanoparticle Delivery with Stabilized Synthetic Liposomes // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, Suppl. 1. – P. 16527.

33. Wang W., Zhou X., Bian Y. et al. Dual-targeting nanoparticle vaccine elicits a therapeutic antibody response against chronic hepatitis B // *Nat. Nanotechnol.* – 2020. – Vol. 15, Suppl. 5. – P. 406-416.
34. Marcandalli J., Fiala B., Ols S. et al. Induction of Potent Neutralizing Antibody Responses by a Designed Protein Nanoparticle Vaccine for Respiratory Syncytial Virus // *Cell.* – 2019. – Vol. 176, Suppl. 6. – P. 1420-1431.
35. Shafifar M., Mozhgani S.H., Razavi Pashabayg K. et al. Selective APC-targeting of a novel Fc-fusion multi-immunodominant recombinant protein (<sup>t</sup>Tax-<sup>t</sup>Env:mFcγ2a) for HTLV-1 vaccine development // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 308. – P. 120920.
36. Silva J.M., Zupancic E., Vandermeulen G. In vivo delivery of peptides and Toll-like receptor ligands by mannose-functionalized polymeric nanoparticles induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immune responses in a melanoma model // *J. Control Release.* – 2015. – Vol. 198. – P. 91-103.
37. Rao D.A., Forrest M.L., Alani A.W. et al. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery // *J. Pharm. Sci.* – 2010. – Vol. 99, Suppl. 4. – P. 2018-2031.
38. Benjaminsen R.V., Matthebjerg M.A., Henriksen J.R. et al. The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH // *Mol. Ther.* – 2013. – Vol. 21, Suppl. 1. – P. 149-157.
39. Zhang L., Wu S., Qin Y. et al. Targeted Codelivery of an Antigen and Dual Agonists by Hybrid Nanoparticles for Enhanced Cancer Immunotherapy // *Nano Lett.* – 2019. – Vol. 19, Suppl. 7. – P. 4237-4249.
40. Du G., Sun X. Engineering nanoparticulate vaccines for enhancing antigen cross-presentation Immunotherapy // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 66. – P. 113-122.
41. Jerjes W., Theodossiou T.A., Hirschberg H. et al. Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research // *J. Clin Med.* – 2020. – Vol. 9, Suppl. 2. – P. 528.

42. Šošić L., Selbo P.K., Kotkowska Z.K. et al. Photochemical Internalization: Light Paves Way for New Cancer Chemotherapies and Vaccines // *Cancers* (Basel). – 2020. – Vol. 12, Suppl. 1. – P. 165.
43. HogenEsch H., O'Hagan D.T., Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want // *NPJ Vaccines*. – 2018. – Vol. 3. – P. 51.
44. Stephen J., Scales H.E., Benson R.A. et al. Neutrophil swarming and extracellular trap formation play a significant role in Alum adjuvant activity // *NPJ Vaccines*. – 2017. – Vol. 23. – P. 2:1.
45. Bai S., Jiang H., Song Y. et al. Aluminum nanoparticles deliver a dual-epitope peptide for enhanced anti-tumor immunotherapy // *J. Control Release*. – 2022. – Vol. 344. – P. 134-146.
46. O'Hagan D.T., Ott G.S., De Gregorio E. et al. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30, Suppl. 29. – P. 4341-4348.
47. Cantisani R., Pezzicoli A., Cioncada R. et al. Vaccine adjuvant MF59 promotes retention of unprocessed antigen in lymph node macrophage compartments and follicular dendritic cells // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 30, Suppl. 29. – P. 4341-4348.
48. Ko E.J , Kang S M. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines // *Hum. Vaccin Immunother.* – 2018. – Vol. 14, Suppl. 12. – P. 3041-3045.
49. O'Hagan D.T, van der Most R., Lodaya R.N. et al. "World in motion" - emulsion adjuvants rising to meet the pandemic challenges // *NPJ Vaccines*. – 2021. – Vol. 6, Suppl. 1. – P. 158.
50. Bryan J.T., Buckland B., Hammond J. et al. Prevention of cervical cancer: journey to develop the first human papillomavirus virus-like particle vaccine and the next generation vaccine // *Curr. Opin .Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 32. – P. 34-47.

51. Luchner M., Reinke S., Milicic A. TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, Suppl. 2. – P. 142.
52. Oberli M.A., Reichmuth A.M., Dorkin J.R. et al. Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy // *Nano Lett.* – 2017. – Vol. 17, Suppl. 3. – P. 1326-1335.
53. Samaridou E., Heyes J., Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2020. – Vol. 154-155. – P. 37-63.
54. Alameh M.G., Tombácz I., Bettini E. et al. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses // *Immunity*. – 2022. – Vol. 55, Suppl. 6. – P. 1136-1138.
55. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B. et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine // *N. Engl. J. Med.* – 2021. – Vol. 384, Suppl. 5. – P. 403-416.
56. Wu D., Zhu L., Li Y. et al. Chitosan-based Colloidal Polyelectrolyte Complexes for Drug Delivery: A Review // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – Vol. 238. – P. 116126.
57. Iqbal M., Lin W., Jabbal-Gill I. et al. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21, Suppl. 13-14. – P. 1478-1485.
58. Carroll E.C., Jin L., Mori A. et al. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons mice // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44, Suppl. 3. – P. 597-608.
59. Koerner J., Horvath D., Herrmann V.L. et al. PLGA-particle vaccine carrying TLR3/RIG-I ligand Riboxsim synergizes with immune checkpoint blockade for effective anti-cancer immunotherapy // *Nat. Commun.* – 2021. – Vol. 12, Suppl. 1. – P. 2935.

60. Караулов А. В., Быков А. С. Обзор исследований вакцин семейства Гриппол и развития современных адъювантов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18, № 4. – С. 101–119.
61. Kostinov M.P., Akhmatova N.K., Khromova E.A. et al. Cytokine Profile in Human Peripheral Blood Mononuclear Leukocytes Exposed to Immunoadjuvant and Adjuvant-Free Vaccines Against Influenza // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 1351.
62. Wang Y., Cella M., Gilfillan S. Cutting edge: polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells // J. Immunol. – 2010. – Vol. 184, Suppl. 6. – P. 2751-2755.
63. Pavlick A., Blazquez A.B., Meseck M. et al. Combined Vaccination with NY-ESO-1 Protein, Poly-ICLC, and Montanide Improves Humoral and Cellular Immune Responses in Patients with High-Risk Melanoma // Cancer Immunol. Res. – 2020. – Vol. 8, Suppl. 1. – P. 70-80.
64. Fortier M.E., Kent S., Ashdown H. et al. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism // Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2004. – Vol. 287, Suppl. 4. – P. R759-66.
65. Gogoi H., Mansouri S., Jin L. The Age of Cyclic Dinucleotide Vaccine Adjuvants // Vaccines (Basel). – 2020. – Vol. 8, Suppl. 3. – P. 453.
66. Yan H., Chen W. The Promise and Challenges of Cyclic Dinucleotides as Molecular Adjuvants for Vaccine Development // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9, Suppl. 8. – P. 917.
67. Wang J., Li P., Yu Y. et al. Pulmonary surfactant-biomimetic nanoparticles potentiate heterosubtypic influenza immunity // V. Science. – 2020. – Vol. 367, Suppl. 6480. – P. eaau0810.
68. Lv M., Chen M., Zhang R. et al. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy // Cell Res. – 2020. – Vol. 30, Suppl. 11. – P. 966-979.

69. Ma Q., Mu Y., Gong L. et al. Manganese-based nanoadjuvants for enhancement of immune effect of DNA vaccines // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 1053872.
70. Wang Z., Yuan Y., Chen C. et al. Colloidal Manganese Salt Improves the Efficacy of Rabies Vaccines in Mice, Cats, and Dogs // *J. Virol.* – 2021. – Vol. 95, Suppl. 23. – P. e0141421.
71. Xu C., Dobson H.E., Yu M. et al. STING agonist-loaded mesoporous manganese-silica nanoparticles for vaccine applications // *J. Control Release.* – 2023. – Vol. 357. – P. 84-93.
72. Huang Y., Ruan Y., Ma Y. et al. Immunomodulatory activity of manganese dioxide nanoparticles: Promising for novel vaccines and immunotherapeutics applications // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1128840.
73. Pulendran B, S Arunachalam P, O'Hagan DT. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2021. -Vol. 20. – P. 454–475. doi: 10.1038/s41573-021-00163-y.
73. Yassine H.M., Boyington J.C., McTamney P.M. et al. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection // *Nat. Med.* – 2015. – Vol. 21, Suppl. 9. – P. 1065-1070.
74. Georgiev I.S., Joyce M.G., Chen R.E. et al. Two-Component Ferritin Nanoparticles for Multimerization of Diverse Trimeric Antigens // *ACS Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 4, Suppl. 5. – P. 788-796.
75. Burkhard P., Lanar D.E. Malaria vaccine based on self-assembling protein nanoparticles // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2015. – Vol. 14, Suppl. 12. – P. 1525-1527.
76. King N.P., Sheffler W., Sawaya M.R. et al. Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy // *Science.* – 2012. – Vol. 336, Suppl. 6085. – P. 1171-1174.

77. King N.P., Bale J.B., Sheffler W. et al. Accurate design of co-assembling multi-component protein nanomaterials // *Nature*. – 2014. – Vol. 510, Suppl. 7503. – P. 103-108.
78. Rodrigues M.Q., Alves P.M., Roldão A. Functionalizing Ferritin Nanoparticles for Vaccine Development // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, Suppl. 10. – P. 1621.
79. Munro H.N., Linder M.C. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism // *Physiol. Rev.* – 1978. – Vol. 58, Suppl. 2. – P. 317-396.
80. Bhaskar S., Lim S. Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications // *NPG Asia Mater.* – 2017. – Vol. 9, Suppl. 4. – P. e371.
81. Pantopoulos K., Porwal S.K., Tartakoff A. et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51, Suppl. 29. – P. 5705-5724.
82. Li C.Q., Soistman E., Carter D.C. Ferritin nanoparticle technology. A new platform for antigen presentation and vaccine development // *Ind. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 2. – P. 143-147.
83. Khoshnejad M., Parhiz H., Shuvaev V.V. et al. Ferritin-based drug delivery systems: Hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting // *J. Control. Release*. – 2018. – Vol. 282. – P. 13-24.
84. Wang W., Liu Z., Zhou X. et al. Ferritin nanoparticle-based SpyTag/SpyCatcher-enabled click vaccine for tumor immunotherapy // *Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 16. – P. 69-78.
85. Rodrigues M.Q., Alves P.M., Roldão A. Functionalizing ferritin nanoparticles for vaccine development // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, Suppl. 10. – P. 1621.
86. Joyce M.G., King H.A.D., Elakhal-Naouar I. et al. A SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine elicits protective immune responses in nonhuman primates // *Sci. Transl. Med.* – 2022. – Vol. 14, Suppl. 632. – P. eabi5735.

87. Uchida M., Kang S., Reichhardt C. et al. The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.* – 2010. – Vol. 1800, Suppl. 8. – P. 834-845.
88. He D., Marles-Wright J. Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology // *New Biotechnol.* – 2015. – Vol. 32, Suppl. 6. – P. 651-657.
89. Wang Z., Xu L., Yu H. et al. Ferritin nanocage-based antigen delivery nanoplatfoms: Epitope engineering for peptide vaccine design // *Biomater Sci.* – 2019. – Vol. 7, Suppl. 7. – P. 1794-1800.
90. Chiou B., Connor J.R. Emerging and dynamic biomedical uses of ferritin // *Pharmaceuticals.* – 2018. – Vol. 11, Suppl. 4. – P. 124.
91. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria // *Trends Microbiol.* – 2014. – Vol. 22, Suppl. 9. – P. 517-527.
92. Wang Q., Suzuki A., Mariconda S. et al. Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum // *EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, Suppl. 11. – P. 2034-2042.
93. Chaban B., Hughes H.V., Beeby M. The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 46. – P. 91-103.
94. Altegoer F., Schuhmacher J., Pausch P. et al. From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: a lesson by the bacterial flagellum // *Biotechnol. Genet Eng. Rev.* – 2014. – Vol. 30, Suppl. 1-2. – P. 49-64.
95. Andersen-Nissen E., Smith K.D., Strobe K.L. et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria // *PNAS of the USA.* – 2005. – Vol. 102, Suppl. 26. – P. 9247-9252.
96. Khim K., Bang Y.J., Puth S. et al. Deimmunization of flagellin for repeated administration as a vaccine adjuvant // *NPJ Vaccines.* – 2021. – Vol. 6, Suppl. 1. – P. 116.
97. Franchi L., Amer A., Body-Malapel M. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages // *Nat. Immunol.* – 2006. – Vol. 7, Suppl. 6. – P. 576-582.

98. Garaude J., Kent A., van Rooijen N. et al. Simultaneous targeting of Tolland nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses // *Sci Transl Med.* – 2012. – Vol. 4, Suppl. 120. – P. 116–120.
99. Yoon S.I., Kurnasov O., Natarajan V. et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling // *Science.* – 2012. – Vol. 335, Suppl. 6070. – P. 859-864.
100. Murthy K.G., Deb A., Goonesekera S. et al. Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, Suppl. 7. – P. 5667-5675.
101. Lightfield K.L., Persson J., Brubaker S.W. et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9, Suppl. 10. – P. 1171-1178.
102. Zhao Y., Li Z., Voyer J. et al. Virus-like particle hybrid platform with high immunogenicity, safety, and versatility for vaccine development // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2022. – Vol. 14, Suppl. 19. – P. 21872-21885.
103. Lu Y., Swartz J.R. Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6, Suppl. 18. – P. 379.
104. Delavari S., Sohrabi M., Ardestani M.S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adjuvant: superiority of a conjugated form of flagellin versus a mixture with a human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidate in the induction of immune responses // *J/ Med/ Microbiol.* – 2015. – Vol. 64, Suppl. 11. – P. 1361-1368.
105. Lin K.H., Chang L.S., Tian C.Y. et al. Carboxyl-terminal fusion of E7 into flagellin shifts TLR5 activation to NLRC4/NAIP5 activation and induces TLR5-independent anti-tumor immunity // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6, Suppl. 24. – P. 199.
106. Lu Y., Welsh J.P., Chan W. et al. *Escherichia coli*-based cell free production of flagellin and ordered flagellin display on virus-like particles // *Biotechnol. Bioeng.* – 2013. – Vol. 110, Suppl. 8. – P. 2073-2085.

107. Lu Y., Swartz J.R. Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6, Suppl. 18. – P. 379.
108. Burdelya L.G., Krivokrysenko V.I., Tallant T.C. et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models // *Science.* – 2008. – Vol. 320, Suppl. 5873. – P. 226-230.
109. Faham A., Altin J.G. Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that can induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, Suppl. 3. – P. 1744-1754.
110. Lee L.H., Burg E., Baqar S. et al. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni* // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67, Suppl. 11. – P. 5799-5805.
111. Tussey L., Strout C., Davis M. et al. Phase 1 safety and immunogenicity study of a quadrivalent seasonal flu vaccine comprising recombinant hemagglutinin-flagellin fusion proteins // *Open Forum. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 3, Suppl. 1. – P. ofw015.
112. Côté-Cyr M., Zottig X., Gauthier L. et al. Self-assembly of flagellin into immunostimulatory ring-like nanostructures as an antigen delivery system // *ACS Biomater Sci. Eng.* – 2022. – Vol. 8, Suppl. 2. – P. 694-707.
113. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А. и др. Изучение иммуногенности гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2015. – №. 2, вып. 81. – С. 96-101.
114. Frey S.E., Lottenbach K., Graham I. et al. A phase I safety and immunogenicity dose escalation trial of plague vaccine, flagellin/F1/V, in healthy adult volunteers (DMID 08-0066) // *Open Forum. Infect.* – 2015. – Vol. 2, Suppl. 1. – P. S235.
115. 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. – Vol. 13, Suppl. 1. – P. 558-568.
116. Chassaing B., Ley R.E., Gewirtz A.T. Intestinal epithelial cell toll-like receptor 5 regulates the intestinal microbiota to prevent low-grade inflammation and metabolic syndrome in mice // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 147, Suppl. 6. – P. 1363-1377.
117. Cullender T.C., Chassaing B., Janzon A. et al. Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellarmotility in the gut // *Cell Host Microbe*. – 2013. – Vol. 14, Suppl. 5. – P. 571-581.
118. Xiao Y., Liu F., Yang J. et al. Over-activation of TLR5 signaling by high-dose flagellin induces liver injury in mice // *Cell. Mol. Immunol.* – 2015. – Vol. 12, Suppl. 6. – P. 729-742.
119. Blohmke C.J., Victor R.E., Hirschfeld A.F. et al. Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, Suppl. 11. – P. 7764-7773.
120. Voegelé L., El Arnaout T., Bailey J. et al. Structural basis of lipoprotein signal peptidase II action and inhibition by the antibiotic globomycin // *Science*. – 2016. – Vol. 351, Suppl. 6275. – P. 876-880.
121. Nakayama H., Kurokawa K., Lee B.L. Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways // *FEBS J.* – 2012. – Vol. 279, Suppl. 23. – P. 4247-4268.
122. Aliprantis A.O., Yang R.B., Mark M.R. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2 // *Science*. – 1999. – Vol. 285, Suppl. 5428. – P. 736-739.
123. Leng C.H., Liu S.J., Chen H.W. et al. Recombinant bacterial lipoproteins as vaccine candidates // *Expert Rev. Vaccines*. – 2015. – Vol. 14, Suppl. 12. – P. 1623-1632.
124. Huang C.Y., Chen J.J., Shen K.Y. et al. Recombinant lipidated HPV E7 induces a Th-1-biased immune response and protective immunity against

- cervical cancer in a mouse model // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, Suppl. 7. – P. e40970.
125. Halliday A., Turner J.D., Guimaraes A. et al. The TLR2/6 ligand PAM2CSK4 is a Th2 polarizing adjuvant in *Leishmania major* and *Brugia malayi* murine vaccine models // *Parasit. Vectors*– 2016. – Vol. 9. – P. 96.
126. Nyirenda M.H., Morandi E., Vinkemeier U. et al. TLR2 stimulation regulates the balance between regulatory T cell and Th17 function: a novel mechanism of reduced regulatory T cell function in multiple sclerosis // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194, Suppl. 12. – P. 5761-5774.
127. Leng C.H., Liu S.J., Chen H.W. et al. Recombinant bacterial lipoproteins as vaccine candidates // *Expert Rev. Vaccines.* – 2015. – Vol. 14, Suppl. 12. – P. 1623-1632.
128. Basto A.P., Piedade J., Ramalho R. et al. A new cloning system based on the OprI lipoprotein for the production of recombinant bacterial cell wall-derived immunogenic formulations // *J. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 157, Suppl. 1. – P. 50-63.
129. Zollinger A.J., Smith M.L. Fibronectin, the extracellular glue // *Matrix Biol.* – 2017. – Vol. 60-61. – P. 27-37.
130. White E.S., Muro A.F. Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models // *IUBMB Life.* – 2011. – Vol. 63, Suppl. 7. – P. 538-546.
131. Lasarte J.J., Casares N., Gorraiz M. et al. The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, Suppl. 2. – P. 748-756.
132. Arribillaga L., Durantez M., Lozano T. et al. A fusion protein between streptavidin and the endogenous TLR4 ligand EDA targets biotinylated antigens to dendritic cells and induces T cell responses in vivo // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – P. 864720.

133. Julier Z., de Titta A., Grimm A.J. et al. Fibronectin EDA and CpG synergize to enhance antigen-specific Th1 and cytotoxic responses // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34, Suppl. 21. – P. 2453-2459.
134. Julier Z., Martino M.M., de Titta A. et al. The TLR4 agonist fibronectin extra domain A is cryptic, exposed by elastase-2; use in a fibrin matrix cancer vaccine // *Sci Rep*. – 2015. – Vol. 5. – P. 8569.
135. Mansilla C., Gorraiz M., Martinez M. et al. Immunization against hepatitis C virus with a fusion protein containing the extra domain A from fibronectin and the hepatitis C virus NS3 protein // *J. Hepatol*. – 2009. – Vol. 51, Suppl. 3. – P. 520-527.
136. San Roman B., De Andres X., Munoz P.M. et al. The extradomain A of fibronectin (EDA) combined with poly (I: C) enhances the immune response to HIV-1 p24 protein and the protection against recombinant *Listeria monocytogenes*-Gag infection in the mouse model // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30, Suppl. 15. – P. 2564-2569.
137. Arribillaga L., Echeverria I., Belsue V. et al. Bivalent therapeutic vaccine against HPV16/18 genotypes consisting of a fusion protein between the extra domain A from human fibronectin and HPV16/18 E7 viral antigens // *Cancer*. – 2020. – Vol. 8, Suppl. 1. – P. e000704.
138. Colaco C.A., Bailey C.R., Walker K.B. et al. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity // *Biomed. Res. Int*. – 2013. – Vol. 461. – P. 230.
139. Verghese J., Abrams J., Wang Y. et al. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. – 2012. – Vol. 76, Suppl. 2. – P. 115-158.
140. Colaco C.A., Bailey C.R., Walker K.B. et al. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity // *Biomed. Res. Int*. – 2013. – Vol. 461. – P. 230.

141. Demine R., Walden P. Testing the role of gp96 as peptide chaperone in antigen processing // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, Suppl. 18. – P. 17573-17578.
142. Wald A., Koelle D.M., Fife K. et al. Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29, Suppl. 47. – P. 8520-8529.
143. McNulty S., Colaco C.A., Blandford L.E. et al. Heat shock proteins as dendritic cell-targeting vaccines—getting warmer // *Immunology.* – 2013. – Vol. 139, Suppl. 4. – P. 407-415.
144. Pack C.D., Gierynska M., Rouse B.T. An intranasal heat shock protein based vaccination strategy confers protection against mucosal challenge with herpes simplex virus // *Hum. Vaccin.* – 2008. – Vol. 4, Suppl. 5. – P. 360-364.
145. Lewis D.J., Wang Y., Huo Z. et al. Effect of vaginal immunization with HIVgp140 and HSP70 on HIV-1 replication and innate and T cell adaptive immunity in women // *J. Virol.* – 2014. – 2008. – Vol. 88, Suppl. 20. – P. 648-657.
146. Davies E.L., Bacelar M.M., Marshall M.J. et al. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL // *Clin. Exp. Immunol.* – 2008. – Vol. 145, Suppl. 1. – P. 183-189.
147. Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Aksenov N.D. et al. The discovery of Hsp70 domain with cell-penetrating activity // *Cell Stress Chaperones.* – 2015. – Vol. 20, Suppl. 2. – P. 343-354.
148. Zhou C.M., Zhang G.X., Ma X.X. Characterization and evaluation of the immune responses elicited by a novel human papillomavirus (HPV) therapeutic vaccine: HPV 16E7-HBcAg-Hsp65 fusion protein // *J. Virol. Methods.* – 2014. – Vol. 197. – P. 1-6.
149. Zhuravleva A., Gierasch L.M. Substrate-binding domain conformational dynamics mediate Hsp70 allostery // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2015. – Vol. 112, Suppl. 22. – P. E2865-E2873.

150. Zhang Y., Ren F., Ni B. et al. Tumor targeting nanoparticle E749-57-HSP110-RGD elicits potent anti-tumor immune response in a CD8-dependent manner in cervical cancer-bearing mouse model // *Hum Vaccin Immunother.* – 2021. – Vol. 17, Suppl. 10. – P. 3529-3538.
151. Ampie L., Choy W., Lamano J.B. et al. Heat shock protein vaccines against glioblastoma: from bench to bedside // *J. Neuro-Oncol.* – 2015. – Vol. 123, Suppl. 3. – P. 441-448.
152. Brauns T., Leblanc P., Gelfand J.A. et al. Could mycobacterial Hsp70-containing fusion protein lead the way to an affordable therapeutic cancer vaccine? // *Expert Rev Vaccines.* – 2015. – Vol. 14, Suppl. 3. – P. 435-446.
153. Shevtsov M., Multhoff G. Heat shock protein-peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 171.
154. Wach M.M., Subject J.R., Wang X.Y. et al. Recombinant human Hsp110-gp100 chaperone complex vaccine is nontoxic and induces response in advanced stage melanoma patients // *Melanoma Res.* – 2022. – Vol. 32, Suppl. 2. – P. 88-97.
155. Wald A., Koelle D.M., Fife K. et al. Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29, Suppl. 47. – P. 8520-8529.
156. Krupka M., Zachova K., Cahlikova R. et al. Endotoxin-minimized HIV-1 p24 fused to murine hsp70 activates dendritic cells, facilitates endocytosis and p24-specific Th1 response in mice // *Immunol. Lett.* – 2015. – Vol. 166, Suppl. 47. – P. 36-44.
157. Zhou C.M., Zhang G.X., Ma X.X. Characterization and evaluation of the immune responses elicited by a novel human papillomavirus (HPV) therapeutic vaccine: HPV 16E7-HBcAg-Hsp65 fusion protein // *J. Virol. Methods.* – 2014. – Vol. 197. – P. 1-6.

158. Yang P., Wang W., Gu H. et al. Protection against influenza H7N9 virus challenge with a recombinant NPM1- HSP60 protein vaccine construct in BALB/c mice // *Antivir. Res.* – 2014. – Vol. 11. – P. 1-7.
159. Mukai T., Maeda Y., Tamura T. et al. Induction of cross-priming of naive CD8+ T lymphocytes by recombinant bacillus Calmette- Guerin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, Suppl. 10. – P. 6561-6568.
160. Souza P.R., Zarate-Blades C.R., Hori J.I. et al. Protective efficacy of different strategies employing *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 against tuberculosis // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2008. – Vol. 8, Suppl. 9. – P. 1255-1264.
161. Duan M.M., Xu R.M., Yuan C.X. et al. SjHSP70, a recombinant *Schistosoma japonicum* heat shock protein 70, is immunostimulatory and induces protective immunity against cercarial challenge in mice // *Parasitol. Res.* – 2015. – Vol. 114, Suppl. 9. – P. 3415-3429.
162. Randazzo M., Terness P., Opelz G. et al. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited // *Int. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 130, Suppl. 10. – P. 2219-2231.
163. Bloch O., Crane C.A., Fuks Y. et al.. Heat-shock protein peptide complex-96 vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single-arm trial // *Neuro-Oncology.* – 2014. – Vol. 16, Suppl. 2. – P. 274-279.
164. Testori A., Richards J., Whitman E. et al. Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 study group // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, Suppl. 6. – P. 955-962.
165. Wald A., Koelle D.M., Fife K. et al. Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29, Suppl. 47. – P. 8520-8529.

166. Einstein M.H., Kadish A.S., Burk R.D. et al. Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III // *Gynecol. Oncol.* – 2007. – Vol. 106, Suppl. 3. – P. 453-460.
167. Goldstone S.E., Palefsky J.M., Winnett M.T. et al. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts // *Dis. Colon Rectum.* – 2002. – Vol. 45, Suppl. 4. – P. 502-507.
168. Derkay C.S., Smith R.J., McClay J. et al. HspE7 treatment of pediatric recurrent respiratory papillomatosis: final results of an open-label trial // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 2005. – Vol. 114, Suppl. 9. – P. 730-737.
169. Roman L.D., Wilczynski S., Muderspach L.I. et al. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia // *Gynecol. Oncol.* – 2007. – Vol. 106, Suppl. 3. – P. 558-566.

## Вакцины на основе вирусоподобных частиц

Традиционные вакцины, такие как инактивированные или живые аттенуированные, продемонстрировали защитную эффективность против ряда инфекционных заболеваний, вызываемых вирусными инфекциями. Однако их применение не лишено проблем, связанных с биобезопасностью вакцин. Последние достижения в области вакцинологии, связанные с разработками на основе нуклеиновых кислот, субъединичных и рекомбинантных вирусных белков, способны преодолеть ограничения традиционных вакцин. Важным также является вопрос, связанный с быстрой разработкой вакцин-кандидатов для борьбы с потенциально возможными пандемиями, вызываемыми новыми инфекционными агентами, и, в первую очередь, вирусными. Разработка и применение технологий быстрого получения вакцин считается необходимым подходом к обеспечению готовности к пандемии и адекватной реакции на ее появление [1]. Одним из возможных решений указанных проблем является применение технологий, основанных на использовании в качестве основы вакцин вирусоподобных частиц. Вирусоподобные частицы (VLP) отличаются от других субъединичных вакцин тем, что они обладают высокой иммуногенностью, поскольку несут в своей структуре повторяющиеся антигенные эпитопы, эффективно презентруемые клеткам иммунной системы для выработки защитного иммунитета [2]. VLP - это неинфекционные мультибелковые структуры, которые имитируют нативные вирусы, но лишены вирусного генома, что делает их безопасными кандидатами для создания вакцин. Благодаря своему оптимальному размеру (20-200 нм) они могут отображать практически любой эпитоп в мультивалентном формате, что гарантирует высокий гуморальный и/или клеточный адаптивный иммунный ответ.

Различают оболочечные и безоболочечные VLP в зависимости от наличия или отсутствия липидных оболочек. Кроме того, эти частицы могут быть

классифицированы как гомологичные или гетерологичные в зависимости от их состава. Гомологичные VLP содержат белки только одного вируса. Гетерологичные VLP содержат белки из разных источников, что повышает их иммуногенность [3]. VLP также классифицируются как одно- или мультикапсидные. Однокапсидные (простые) VLP состоят из одного капсидного белка, который экспрессируется как в эукариотических, так и в прокариотических системах. Напротив, мультикапсидные VLP обладают несколькими слоями, построенными различными капсидными белками. Мультикапсидные VLP обычно образуются в таких системах экспрессии эукариот, как дрожжи, клетки насекомых и растения. Например, различные комбинации четырех различных ротавирусных капсидных белков могут давать стабильные VLP с двойными или тройными капсидными слоями [4].

Важным свойством VLP является возможность декорирования ее поверхности гетерологичными структурами, то есть белками или фрагментами белков других вирусов. В таких случаях получают VLP, построенные из химерных субъединиц. Одна часть химерной субъединицы отвечает за формирование VLP, а вторая (наружная) выполняет функцию антигена. Получение химерных VLP, построенных из гетерологичных белков, осуществляется с помощью генной инженерии или химической конъюгации. Размер декорирующей вставки имеет значение для сборки VLP и правильной презентации антигена. Небольшие белки или их фрагменты, несущие несколько эпитопов, достаточно легко встраиваются в структуру VLP, не влияя на ее самосборку [5].

VLP несут молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном (PAMP), которые распознаются рецепторами распознавания патогенов (паттерн-распознающие рецепторы, PRR), присутствующими либо на поверхности клетки, либо на эндосомах дендритных клеток. Презентация пептидов, являющихся фрагментами белков, входящих в состав VLP, молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I или класса II активирует

CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетки соответственно [6]. Результатом является формирование гуморального и клеточного иммунитета. Наличие большего количества иммуногенных доменов в составе VLP повышает иммуногенность в сопоставлении с отдельными мономерными белками. В результате VLP способны вызывать защитный ответ при сравнительно низких дозах антигена, что значительно снижает стоимость вакцинации [7].

Так, VLP на основе HBcoreAg оказались отличной платформой для презентации эпитопов благодаря их способности эффективно взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками, отображать гетерологичные эпитопы с высокой плотностью и оказывать помощь Т-клеткам. Core антиген вируса гепатита В, экспрессируемый в рекомбинантных системах, может самособирается в VLP с симметрией T=3 или T=4. VLP чрезвычайно иммуногенны и успешно применены для максимизации иммуногенного и защитного потенциала высококонсервативных эпитопов SP55 и SP70 разных субгенотипов вируса EV71. Получение таких химерных VLP показало возможность разработки универсальной вакцины против EV71 на основе VLP и пептидов [8].

С появлением технологий скрининга и обнаружения иммуногенных фрагментов белков-антигенов стало возможным проектировать функции VLP и разрабатывать вакцины с повышенной иммуногенностью и повышенной стабильностью [9]. Для повышения иммуногенности также используют включенные в состав VLP соединения разного рода (агонисты паттерн-распознающих рецепторов), способные активировать врожденные иммунные реакции, в основном за счет стимуляции профессиональных дендритных клеток к продукции цитокинов [10].

VLP могут быть получены с использованием рекомбинантных вирусных белков, которые экспрессируются в ряде систем экспрессии, включая прокариотические клетки, дрожжи, клеточные линии насекомых, растения и клеточные линии млекопитающих. Кроме того, успешно используются

методы бесклеточной экспрессии. В этих случаях белки VLP сначала экспрессируются в системе экспрессии на клеточной основе, затем собираются в бесклеточной среде [11]. Все системы имеют свои преимущества и недостатки, которые кратко перечислены в Таблице 2.

Оптимальная экспрессия каждого VLP обычно определяется с помощью метода проб и ошибок путем сравнения полученных продуктов нескольких систем экспрессии. Экспрессию в *E. coli* часто предпочитают для производства небольших белков с ограниченным гликозилированием. В свою очередь, по сравнению с высшими эукариотами дрожжи считаются экономически эффективной производственной системой. Кроме того, дрожжи позволяют избежать проблем с эндотоксином и вирусной контаминацией, связанных с системами экспрессии бактерий и млекопитающих [14].

Engerix-B (вакцина против ВГВ) и Gardasil (вакцина против вируса папилломы человека (ВПЧ)) - две вакцины, одобренные FDA, которые были созданы в системах экспрессии дрожжей. Несмотря на указанные выше достоинства, особенности гликозилирования является основным недостатком дрожжей, что ограничивает их использование для получения VLP без оболочки. Напротив, платформы для экспрессии клеток животных привлекательны из-за их способности воспроизводить сложное и адекватное гликозилирование, что необходимо для правильного сворачивания белка [15].

Благодаря простоте и скорости экспрессии VLP на основе бакуловируса эта система подходит для производства вакцин против вирусов, которые быстро меняют свои поверхностные антигены между вспышками инфекционных заболеваний, таких как вирус гриппа [16].

Таблица 2

Преимущества и недостатки различных платформ для получения вакцин на основе VLP [12]

| Платформа | Достоинства   | Недостатки   |
|-----------|---|--|
| Бактерии  | 1) Низкая стоимость<br>2) Простые в использовании<br>3) Быстрые темпы роста бактерий<br>4) Хорошая масштабируемость<br>5. Высокий уровень экспрессии и соответственно высокий выход белка   | 1) Отсутствует посттрансляционная модификация<br>2) Наличие в продукте компонентов клеток-хозяев<br>3) сложность получения растворимых белков VLP  |
| Дрожжи    | 1) Невысокая стоимость<br>2) Высокая скорость ферментации<br>3) Возможность модификация платформы экспрессии<br>4) Умеренно быстрая экспрессия<br>5) Наличие посттрансляционной модификации | 1) Высокое содержание маннозы в углеводной част белка, что сокращает период полураспада рекомбинантного белка в крови [13]<br>2) Необходимы повышенные меры предосторожности<br>3) Проблемы с продукцией высокомолекулярных белков |
| Насекомые | 1) Умеренно быстрая экспрессия<br>2) Фолдинг и  | 1) Высокая стоимость<br>2) Низкая масштабируемость<br>3) Простое N-  |

|                                 |  |   |
|---------------------------------|--|---|
|                                 | <p>гликозилирование</p> <p>3) Применима для получения безоболочечных и оболочных VLP</p> <p>4) Не содержит патогенов млекопитающих</p>                         | <p>гликозилирование</p> <p>4) Заражение бакуловирусом</p> <p>5) Низкий уровень экспрессии</p> <p>6) Сложности с масштабированием</p>  |
| Млекопитающие                   | <p>1) Применима для VLP с оболочкой и без оболочки</p> <p>2) Адекватное гликозилирование</p> <p>3) Аутентичная сборка и сворачивание рекомбинантных белков</p> | <p>1) Высокая стоимость</p> <p>2) Сложность масштабирования</p> <p>3) Большие затраты времени</p> <p>4) Низкий выход</p> <p>5) Восприимчивость к заражению патогенами млекопитающих</p>                   |
| Растения                        | <p>1) Быстрая экспрессия</p> <p>2) Высокая масштабируемость</p> <p>3) Низкая стоимость</p>   | <p>1) Низкая эффективность</p> <p>2) Нормативные и технологические проблемы</p> <p>3) Деградация антигена при оральном употреблении</p> <p>4) Проблемы с фолдингом, стабильностью и гликозилированием</p> |
| Бесклеточная система экспрессии | <p>1) Экономия времени</p> <p>2) Высокий выход белков</p> <p>3) Ограниченное количество клеточных контаминантов</p>  | <p>1) Очень высокая стоимость производства</p> <p>2) Ограниченная масштабируемость</p>  |

Основным недостатком платформы на основе бакуловируса/клеток насекомых является простая схема N-гликозилирования по сравнению с млекопитающими.

Применяется получение VLP в трансгенных растениях. Хотя в растительных клетках отсутствуют механизмы гликозилирования, подобные млекопитающим, растения использовались для получения VLP ряда вирусов [17-19]. Другой недавно разработанной платформой для экспрессии является бесклеточная система, которая обычно состоит из экстрактов, полученных из *E. coli* или дрожжевых клеток. Эта система удобна для производства вирусных капсидных белков с токсичными промежуточными формами. Метод требует больших затрат и имеет ограничения по масштабируемости. Примеры коммерческих VLP-вакцин, произведенных в бесклеточной системе экспрессии, включают вакцину против гриппа Inflexal V и вакцины против гепатита A Eраxal [20, 21].

Бактериальные системы (в основном *E. coli*) используются для производства примерно 28% всех VLP. В этих системах вирусные гены оптимизированы по кодонам для бактерий и клонированы в коммерческие плазмиды с сильными промоторами для получения более высоких урожаев и легкой начальной очистки [22, 23].

Разработка методов получения безоболочечных VLP в простых системах экспрессии создает потенциал для рационализации технологических биопроцессов и предсказуемую биобезопасность. Безоболочечные VLP структурно менее сложны, чем их оболочечные аналоги, и могут нарабатываться как в простых прокариотических (*E. coli*), так и в эукариотических системах (дрожжи). Это делает их легко масштабируемыми, экономически эффективными и быстрыми в производстве. Отработанные технологические процессы в перспективе позволят значительно сократить время для производства вакцин. Учитывая непредсказуемость глобальных вспышек многих инфекционных заболеваний, технологии, использующие

химерные VLP в качестве иммуногена для создания вакцин, являются актуальными для решения проблем, связанных с быстрым распространением новых вирусов [24].

Одним из успешных подходов для формирования VLP, декорированных чужеродными антигенами, явилось использование VP1 норовируса, который состоит из двух доменов: наружного (P) и внутреннего (S). Эти домены соединены между собой естественным линкером – шарнирным регионом. Каждый из этих доменов способен самостоятельно формировать VLP. С использованием S домена оболочки норовируса, который естественным образом формирует внутреннюю оболочку капсида, была разработана технология получения 60-валентных икосаэдрических наночастиц с помощью системы экспрессии в *E. coli*. Такая поливалентная наночастица с 60 открытыми шарнирными регионами С-концевой области домена S представляет собой удобную платформу для презентации гетерологичных антигенов на поверхности VLP [25].

Из-за высокоупорядоченной и повторяющейся пространственной структуры вирусоподобных частиц, которые в значительной степени индуцируют сшивание В-клеточных рецепторов, вакцины на основе вирусоподобных частиц могут сильно активировать В-клетки даже в отсутствие Т-хелперов. В настоящее время выпускаются вакцины на основе вирусоподобных частиц, например вакцины Церварикс® и Гардасил® против вируса папилломы человека для профилактики рака шейки матки и другие [26].

Высокая иммуногенность является важным свойством вакцины, во многом определяющим ее эффективность. Для создания высокоиммуногенной VLP антигены в её составе должны быть расположены стерически правильно, чтобы максимизировать их презентацию иммунной системе. С этой целью часто применяется слияние N- или С-концов вирусных белков VLP с требуемыми антигенными пептидами [27]. Представлены работы, в которых пептидные эпитопы включены в полипептидную цепь экспонированных на

поверхности VLP петель белков, формирующих VLP. Таким образом встроенные пептиды представлены на поверхности VLP, что делает их легкодоступными для обнаружения иммунной системой. Примерами могут служить VLP-платформы на основе HBsAg, папилломавируса (бычьего и человеческого), flock house virus и др. [28-30].

Есть и другие примеры вирусоподобных частиц, декорированных гетерологичными антигенами. Например, в вакцине против рака молочной железы антигенные эпитопы HER2 пришиты к 30-нанометровому икосаэдрическому вирусу мозаики коровьего гороха (CPMV) [32]. Примерами высокоиммуногенных вакцин на основе VLP являются экспериментальные VLP -вакцины против альфавирусов и полиомавирусов [33]. Несколько вакцин на основе VLP успешно прошли клинические испытания, включая вакцину против чикунгуньи, вакцину против гриппа, вакцину Neoson и другие вакцины.

Поскольку VLP сами нередко демонстрируют адьювантные свойства, использование VLP-платформ снижает зависимость от дополнительных адьювантных компонентов. Адьювантные свойства VLP индуцируют как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ, что позволяет избегать введения в состав вакцины лишнего, потенциально вредоносного компонента [31]. Простота, эффективность и безопасность VLP позволяют применять их для производства самых разных вакцин, в том числе и для особо уязвимых категорий населения, таких как пожилые люди, носителей хронических заболеваний, а также для детей младшего возраста.

### Список литературы

1.Loomis R.J., Stewart-Jones G.B.E., Tsybovsky Y. et al. Structure-based design of nipah virus vaccines: A generalizable approach to paramyxovirus immunogen development // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 842.

2. Tariq H., Batool S., Asif S. et al. Virus-like particles: Revolutionary platforms for developing vaccines against emerging infectious diseases // *Front Microbiol.* -2021. – Vol. 12. P. 790121.
3. Prates-Syed W.A., Chaves L.C.S., Crema K.P. et al. VLP-based COVID-19 vaccines: An adaptable technology against the threat of new variants // *Vaccines (Basel)*. – 2021. – Vol. 9(12). doi: 10.3390/vaccines9121409.
4. Crawford S.E., Labbe M., Cohen J. et al. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells // *J. Virol.* – 1994. – Vol. 68(9). – P. 5945–5952.
5. Mateu M.G. Virus engineering: Functionalization and stabilization // *Protein Engineering, Design & Selection*. – 2011. – Vol. 24, Suppl. 1-2. – P. 53–63.
6. Chackerian B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development // *Expert Rev. Vaccines*. – 2007. – Vol. 6(3). – P. 381–390.
7. Roldao A., Mellado M.C., Castilho L.R. et al. Virus-like particles in vaccine development // *Expert Rev. Vaccines*. – 2010. – Vol. 9(10). -P. 1149–1176.
8. Foged C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems // *Ther. Deliv.* – 2011. – Vol. 2, Suppl. 8. – P. 1057–1077.
9. Collins K.A., Snaith R., Cottingham M.G. et al. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 46621.
10. Rosenthal J.A., Chen L., Baker J.L. et al. Pathogen-like particles: Biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale // *Curr. Op. in Biotechnol.* – 2014. – Vol. 28. – P. 51–58.

11. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S. et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers // *J. Nanobiotechnol.* – 2021. – Vol. 19(1). – P. 59.
12. Gupta R., Arora K., Roy S. S. et al. Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1123805.
13. Kulagina N., Besseau S., Godon C. et al. Yeasts as biopharmaceutical production platforms // *Front. Fungal Biol.* – 2021. – Vol. 2. doi: 10.3389/ffunb.2021.733492.
14. Braeden Donaldson F.A.-B., Young V., Scullion S., Ward V. et al. Virus-like particles, a versatile subunit vaccine platform // *Subunit Vaccine Delivery.* – 2015. – P. 159–80.
15. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S. et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers // *J. Nanobiotechnol.* – 2021. – Vol. 19(1). -P. 59.
16. Fuenmayor J., Godia F., Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines // *N. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 39 (Pt B). – P. 174–80.
17. Tacket C. O. Plant-based vaccines against diarrheal diseases // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2007. – Vol. 118. – P. 79–87.
18. Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G. et al. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 182(1). – P. 302–305.
19. Scotti N., Alagna F., Ferraiolo E. et al. High-level expression of the HIV-1 Pr55gag polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts // *Planta.* – 2009. – Vol. 229(5). – P. 1109–1122.

20. Herzog C., Hartmann K., Kunzi V. et al. Eleven years of inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27(33). – P. 4381–437.
21. Bovier P.A. Recent advances with a virosomal hepatitis A vaccine // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2008. – Vol. 8(8). – P. 1177–1185. doi: 10.1517/14712598.8.8.1177.
22. Huang X., Wang X., Zhang J. et al. Escherichia coli-derived virus-like particles in vaccine development // *NPJ Vaccines*. – 2017. – Vol. 2. – P.3. doi: 10.1038/s41541-017-0006-8.
23. Le D.T., Muller K.M. In vitro assembly of virus-like particles and their applications // *Life. Basel*. – 2021. – Vol. 11(4). doi: 10.3390/life11040334
24. Berti F., Adamo R., Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives // *ACS Chem. Biol.* 2013; 8, Suppl. 8: 1653–1663.
25. Kastenmuller W., Kastenmuller K., Kurts C. et al. Dendritic cell-targeted vaccines - hope or hype? // *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14, Suppl. 10: 705–711.
26. Adepoju P. RTS, S malaria vaccine pilots in three African country // *Lancet*. – 2019. – Vol. 393. – P. 1685. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30937-7.
27. De Filette M., Martens W., Smet A. et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies // *Vaccine*. - 2008. - Vol. 26, №51. - P. 6503–6507.
28. Slupetzky K., Gambhira R., Culp T.D., et al. A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces crossneutralizing antibodies to HPV11 // *Vaccine*. - 2007. - Vol. 25, №11. - P. 2001–2010.
29. Murata Y., Lightfoote P.M., Rose R.C., et al. Antigenic presentation of heterologous epitopes engineered into the outer surface-exposed helix 4 loop region of human papillomavirus L1 capsomeres // *Virology Journal*. - 2009. - Vol. 6. - P. 81.

30. Ye X., Ku Z., Liu Q., et al. Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms // *J. Virol.* - 2014. - Vol. 88, № 1. - P. 72–81.
31. Chroboczek J., Szurgot I. Szolajska E. Virus-like particles as vaccine // *Acta Biochimica Polonica.* - 2014. - Vol. 61, № 3. - P. 531–539.
32. Shukla S. Plant viral nanoparticles-based HER2 vaccine: Immune response influenced by differential transport, localization and cellular interactions of particulate carriers. - *Biomaterials.* – 2017. – Vol. 121. – P. 15–27.
33. Chang L.J., Dowd K.A., Mendoza F.H., et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. - *Lancet.* - 2014. - Vol 384. - P. 2046–2052.

## Мукозальные вакцины

Примерно 90% патогенов проникают в ткани организма через слизистые оболочки, включая желудочно-кишечную, респираторную и мочеполовую системы. Эти поверхности слизистой оболочки особенно уязвимы для инфекционных агентов из-за их большей площади, тонкого и проницаемого барьера по сравнению с кожей. Иммунные реакции слизистой оболочки имеют решающее значение в качестве первичной защиты от патогенов и их токсинов, поражающих поверхности слизистой оболочки. Традиционные способы вакцинации обычно включают внутримышечные или подкожные инъекции, которые вызывают системный иммунный ответ. Однако эти способы могут не обеспечивать оптимальной защиты от респираторных и кишечных патогенов, поскольку они не стимулируют иммунитет слизистой оболочки, который имеет решающее значение для защиты от таких инфекций. Для воздействия на слизистые поверхности и индукцию местного иммунитета в месте проникновения инфекции используются мукозальные вакцины. Различают две большие группы мукозальных вакцин: пероральные (оральные) и интраназальные (назальные) вакцины. Первые вводят через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта (*per os*), вторые наносят на слизистую носовой пазухи. Таким образом вакцинный антиген доставляется к месту проникновения инфекционного агента, что подготавливает условия для эффективной иммунной реакции при инфицировании организма. В настоящем разделе представлена информация о разработке пероральных и интраназальных вакцин.

Первая пероральная вакцина, доказавшая свою эффективность, была введена в практику здравоохранения в 1960-х годах. Это была вакцина против полиомиелита. Она по-прежнему широко используется сегодня во многих странах для профилактики полиомиелитной инфекции [1]. Пероральный путь вакцинации вызывает иммунный ответ, аналогичный иммунному ответу при традиционной внутримышечной или подкожной иммунизации [2]. Однако

способность слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта индуцировать иммунитет в данном случае ограничена [3]. Целью пероральных вакцин является стимуляция иммунных реакций в тканях слизистой оболочки, выстилающей желудочно-кишечный тракт. При приеме пероральных вакцин возникает ряд проблем, связанных с быстрым разложением компонентов вакцины в желудочно-кишечном тракте. Низкий уровень рН в желудке, присутствие различных протеолитических ферментов в желудочно-кишечном тракте создают риск полного разложения антигенов до того, как они достигнут целевых иммунных клеток. Для преодоления этих проблем был разработан ряд подходов к защите антигенов. Один из распространенных подходов заключается в инкапсуляции антигена в специализированные носители, обеспечивающие защиту во время прохождения через пищеварительную систему. Эти носители обычно состоят из таких материалов, как липосомы, микросферы или наночастицы на основе белка. Кроме того, антигены пероральных вакцин обычно конструируют так, чтобы они были более устойчивы к разложению протеолитическими ферментами. Обычно это или модификация структуры или включение в состав вакцины стабилизирующих агентов, противостоящих ферментативному расщеплению [4, 5].

Несмотря на возникающие, в связи с этим, трудности за рубежом одобрены вакцины, нацеленные на кишечные патогены, такие как ротавирусная, энтеротоксигенная *кишечная палочка*, холерный вибрион и *шигелла* (*S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* и *S. dysenteriae*). Эти вакцины также эффективны против патогенов, которые попадают в организм через слизистую оболочку кишечника [6].

Иммунный ответ на пероральную иммунизацию зависит от дозы вакцины, частоты введения, формы антигена и метаболизма индивидуума [7]. Иммуногенность антигенных белков, вводимых через слизистую оболочку

Таблица 3.

Различия между классической инъекционной вакцинацией и оральной вакцинацией

| <b>Тип вакцинации</b> | <b>Классическая инъекционная вакцинация</b>  | <b>Пероральная вакцинация</b>   |
|-----------------------|--|---|
| Способ введения       | Инъекция с помощью иглы и шприца   | Пероральное введение через желудочно - кишечный тракт   |
| Доставка антигенов    | Вводятся в мышцу или подкожную клетчатку   | Доставляются на слизистую оболочку желудочно- кишечного тракта  |
| Иммунный ответ        | Стимулирует иммунитет  | Стимулирует как системный, так и слизистый иммунитет  |
| Иммунный путь         | Генерирует иммунный ответ за счет презентации антигена циркулирующим клеткам                         | Генерирует иммунный ответ за счет презентации антигена лимфоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой |
| Дозировка             | Требуется меньшее количество антигена на дозу  | Требуется большее количество антигена на дозу   |
| Стабильность          | Вакцина обычно стабильна при комнатной температуре или в холодильнике                                | Для вакцины могут потребоваться особые температура и условия хранения                                     |
| Адьюванты             | Часто требуются адьюванты для усиления иммунного ответа  | Могут не потребоваться адьюванты  |
| Стоимость             | Связаны с дополнительными расходами, связанными с использованием игл, шприцев и обученного персонала | Могут снизить затраты, связанные с использованием игл, шприцев и обученного персонала                     |
| Безопасность          | Возможность побочных реакций, таких как реакции в месте инъекции                                     | Возможность побочных реакций, таких как расстройство желудочно-кишечного тракта                           |

полости рта, слаба и обычно усиливается добавлением специфических адьювантов. Адьюванты в составе вакцины обычно распознаются Toll-подобными рецепторами макрофагов желудочно-кишечного тракта и дендритных клеток и формируют вспомогательные активационные сигналы,

усиливающие иммунные реакции. Различия между классической инъекционной вакцинацией и оральной вакцинацией представлены в таблице 3.

При вакцинации дендритные клетки и соответствующие цитокины играют решающую роль в определении доли активирующихся  $CD4^+$  Т-клеток. Активированные Th1 клетки высвобождают цитокины, такие как интерферон  $IFN-\gamma$  и фактор некроза опухоли  $TNF-\alpha$ . Эти цитокины активируют клеточный иммунитет и индуцируют продукцию В-клетками нейтрализующих антител изотипа IgG2a [8]. При дифференцировке Т-клеток в сторону Th2 индуцируется секреция IL-4, 5, 10 и 13, которые способствуют выработке антител классов IgE, IgA и IgG. Цитотоксические иммунные реакции, осуществляемые  $CD8^+$  Т-клетками, инициируются при использовании липосом, биоразлагаемых микрочастиц и свободной ДНК. Наиболее характерным аспектом иммунного ответа, вызываемого иммунитетом слизистой оболочки полости рта, является выработка секретиремого IgA (sIgA). После пероральной инокуляции антиген захватывается М-клетками, активирующими дендритные клетки и популяции Т-клеток [9]. Пероральные вакцины в первую очередь нацелены на лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником (GALT). GALT способна индуцировать сильные и специфичные иммунные реакции слизистой оболочки, включая продукцию sIgA, антителосекретирующих клеток, Т- и В-клеток памяти [10]. Разработаны рекомбинантные пероральные вакцины против HBsAg, столбнячного токсина, дифтерийного токсина и коклюшного токсина [11-14]. Пероральные вакцины менее эффективны в стимуляции гуморальных иммунных реакций по сравнению с внутримышечными инъекциями, но они более эффективны в индукции местных клеточно-опосредованных иммунных реакций [15]. Иммуногенность оральных антигенов значительно повышают холерный токсин, термостабильный белок *E. coli*, фосфолипаза А, фосфатидилглицерин, мотивы CpG

бактериальной ДНК, иммуностимулирующие комплексы, актин и цитокины. Использование только адъювантов может привести к неадекватным или субоптимальным иммунным реакциям. Однако, когда адъюванты смешиваются с другими антигенами, они могут эффективно стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [16]. Среди этих адъювантов особого внимания заслуживают холерный токсин и термостабильный белок *E. coli* [17]. Холерный токсин проявляет адъювантные свойства через ганглиозидный рецептор GM1, усиливает экспрессию костимулирующих молекул на поверхности дендритных клеток и тем самым усиливает их способность презентировать антигены [18]. Ведутся работы по получению рекомбинантных субъединиц холерного токсина путем сайт-направленного мутагенеза [19]. Этот подход значительно снижает токсичность при сохранении высокой адъювантной активности.

Используемые в пероральных вакцинах микросферы представляют собой тип биоразлагаемого материала с однородным размером частиц и включают микросферы из полилактидгликолида, микросферы из полимолочной кислоты, полипропиленовые микросферы, крахмальные микросферы и альгинатные микросферы. Большинство микросфер являются натуральными и нетоксичными и обладают адгезивным эффектом по отношению к антигенам. Этот эффект помогает антигенам проходить через слой эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника. При использовании микросфер в качестве системы-носителя иммунный ответ может быть избирательно индуцирован однократным пероральным введением низкой дозы антигена. Микросферы также высвобождают антигены медленно и в контролируемых количествах, что приводит к значительному снижению требуемой дозы антигена. Иммунный ответ, запускаемый микросферами, тесно связан с их диаметром, и как системы доставки они обещают быть сравнительно безопасными [20, 21].

В качестве переносчиков антигена используют также бактерии. Так, плазмиды, содержащие нетоксичный С-фрагмент столбнячной палочки, после перорального введения могут экспрессировать нетоксичный С-фрагмент белка в *Lactobacillus plantarum*, что приводит к выработке специфичных к нетоксичному С-фрагменту антител класса IgG [22].

Значительные успехи были также достигнуты в изучении вирусных агентов как переносчиков вакцинного антигена. Особо заслуживающие внимания достижения включают вакцины для слизистых оболочек, в которых полиовирус и аденовирус используются в качестве живых переносчиков. Исследования продемонстрировали, что полиовирусный вектор, несущий антиген, может активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки, тем самым регулируя активность IgA-ассоциированных В-клеток и генерируя специфические цитотоксические Т-лимфоциты. В пероральной вакцине против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в качестве переносчика используется полиовирус. Ген оболочки полиовируса заменен генами *pol* и *gag* ВИЧ, и полученный рекомбинантный вирус экспрессирует белок оболочки вируса Р1. В пероральной вакцине против кори в качестве переносчика используется рекомбинантный дефектный аденовирус. Этот вектор содержит мутировавшую форму промотора цитомегаловируса, у которого отсутствует часть области E1, и он успешно индуцирует Т-клеточный иммунный ответ у мышей посредством экспрессии белка Н вируса кори [23-25].

Концепция производства оральных вакцин с использованием съедобных растений была предложена еще в начале 1990-х годов [26]. Пероральные вакцины на растительной основе относятся к вакцинам, получаемым из генетически модифицированных растений. Иммунитет, обеспечиваемый растительными пероральными вакцинами, достигается при приеме внутрь растительного материала, содержащего антигенный вакцинный материал. Достигнуты заметные успехи в получении растительных вакцин. К настоящему времени к антигенам, экспрессируемым в трансгенных растениях,

относятся поверхностный антиген вируса гепатита В [27], секреторный белок вируса туберкулеза и гликопротеин гемагглютинина вируса кори [28] Для получения вакцин используются такие растения как табак, картофель, арабидопсис, соя, арахис, салат, морковь, помидоры, белый клевер, люцерна, кукуруза, ламинария и люпин [29-41].

Трансгенные растительные вакцины обладают рядом преимуществ перед другими вакцинами. К ним относятся низкие производственные затраты, масштабируемость и безопасность. Экспрессируемые трансгенными растениями антигены могут стимулировать специфический иммунный ответ без необходимости в адьювантах [42]. Пероральные вакцины на растительной основе не требуют обработки, очистки или криоконсервации, что делает их простыми в использовании. Однако уровень экспрессии антигенов в трансгенных растениях относительно низок. Кроме того, хотя трансгенные растения могут повышать иммуногенность антигенов, они также вызывают риск нарушения толерантности организма к пище, например, новые аллергические реакции на продукты, которые ранее не вызывали аллергии. Могут усиливаться также существующие аллергические реакции за счет повышения чувствительности иммунной системы к определенным антигенам, содержащимся в пищевых продуктах. Ведутся дальнейшие исследования по изучению пероральных вакцин на растительной основе.

Благодаря своим вкусовым качествам, отсутствию токсичных ингредиентов и высокому содержанию питательных веществ большинство овощей считаются пригодными для использования в качестве пероральных вакцин на растительной основе. Среди овощей картофель стал основной растительной моделью для разработки пероральных вакцин на растительной основе [43]. Однако, применимость картофеля ограничивает необходимость варить его перед употреблением. Помидоры также стали многообещающей системой экспрессии и успешно использовались для переноса различных

генов, таких как ген поверхностного антигена вируса гепатита В, гены gag и gp ВИЧ и белок оболочки вируса бешенства. Кроме того, были достигнуты значительные успехи в культивировании тканей и генетической трансформации моркови, что делает ее еще одним возможным кандидатом для изучения оральных вакцин на растительной основе. Например, морковь использовалась для экспрессии гемагглютинаина вируса кори, который проявляет как антигенность, так и иммуногенность. Этот генно-инженерный белок способен стимулировать иммунный ответ Th2 типа [44-47], что указывает на его способность активировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Кроме того, структурный белок VP1 вируса ящура также был эффективно экспрессирован в листьях моркови [48].

Однако большинство овощей не обладают высоким содержанием белка, что может препятствовать экспрессии антигенов [49]. Проводятся исследования по изучению фруктов как возможного варианта пищевых пероральных вакцин. Например, вакцины на основе бананов с использованием специфичных для фруктов стимуляторов, могут быть использованы для профилактики заболеваний путем их употребления в пищу. Папайю, широко распространенный тропический и субтропический фрукт, можно употреблять в сыром виде. Методы трансформации папайи хорошо зарекомендовала себя и в настоящее время она считается оптимальным кандидатом для производства пероральных вакцин [50, 51]. Для производства пероральных вакцин подходящими кандидатами считаются также семена растений, которые содержат значительное количество растворимого белка и которые могут сохранять свои качества при соблюдении условий хранения. Зерновые культуры, такие как кукуруза и рис, хорошо подходят для этих целей из-за обилия растворимых белков в эндосперме, которые могут быть отделены от остальной части семян, тем самым повышая концентрацию антигена и снижая требуемую дозировку [52]. Ведутся исследования по использованию трансгенных водорослей в качестве биореакторов для производства

экзогенных белков. Используются генетически трансформированные цианобактерии и спирулина *Arthrospira platensis* (спирулины) [53-55].

Перспективными кандидатами для индукции необходимого иммунного ответа и обеспечения возможности перорального введения являются *Bacillus subtilis*, дрожжи и наночастицы. Эти инновационные вакцинные векторы обладают уникальными преимуществами, такими как присущая им иммуногенность и способность проходить через желудочно-кишечный тракт без повреждений. *B. subtilis*, универсальная бактерия, может эффективно доставлять антигены и стимулировать как местные (слизистые), так и системные иммунные реакции. Дрожжи также продемонстрировали свой потенциал в индукции сильных гуморальных и клеточных иммунных реакций [56-58]. Можно заключить, что безопасность, эффективность, удобство и экономичность пероральных вакцин делают их отличным вариантом профилактики заболеваний.

Второй, но не менее значимой группой мукозальных вакцин являются интраназальные вакцины. Они предназначены для профилактики респираторных инфекций. В этом случае инфекционные агенты проникают в организм через дыхательный тракт и в организм встречается с ними в первую очередь при прохождении носовой пазухи. Слизистая оболочка носа, тонкая мембрана, выстилающая носовые ходы, представляет собой стратегическую точку проникновения многих респираторных патогенов [59].

Полость носа богата лимфоидной тканью, широко известной как лимфоидная ткань, ассоциированная с носом (NALT) [60]. Она может индуцировать многомерные защитные иммунные реакции, включая иммунитет слизистой оболочки, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет и тренированный иммунитет, оказывая, таким образом, широкий спектр защитных эффектов [61, 62]. Функционально иммунную систему слизистой оболочки носа можно разделить на индукционную и

эффекторную. NALT является основным местом индукции иммунитета, с которого начинается индукция иммунного ответа. Важной структурой NALT у людей является кольцо Вальдейера. [63]. NALT состоит из эпителиальных клеток и микроспиральных (М) клеток, которые специализированы для поглощения антигена. Базальный участок М-клеток представляет собой специализированную лимфоидную ткань, богатую В-клетками, Т-клетками, дендритными клетками и макрофагами. Являясь трансмембранным переносчиком, М-клетки способны эндоцитозировать интернализирующие антигены, появляющиеся на их внешних мембранах. Впоследствии эти антигены переносятся в антиген-представляющие клетки, такие как дендритные клетки и макрофаги, где они подвергаются обработке и презентации [64]. Антиген-представляющие клетки мигрируют в межфолликулярную зону Т-клеток и фолликулярную зону В-клеток, где эти клетки презентуют антигены наивным Т-клеткам для инициации адаптивного клеточного иммунитета [65].

---

Стимулированные антигеном Т-клетки продуцируют интерлейкин-5 (IL-5) и трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) для активации В-клеток, затем активированные В-клетки дифференцируются в антигенспецифичные IgA<sup>+</sup> В-клетки. Антигенспецифические Т-клетки и IgA<sup>+</sup> В-клетки мигрируют в эффекторные участки и запускают иммунный ответ, включая собственную пластинку и интраэпителиальный слой слизистой оболочки дыхательных путей [66]. В присутствии IgA-индуцирующих цитокинов (IL-6, IL-10 и IL-21) IgA<sup>+</sup> В-клетки дифференцируются в IgA-продуцирующие плазматические клетки [67].

IgA, продуцируемый плазматическими клетками, связывается с полимерным Ig-рецептором (pIgR) на эпителиальных клетках и может транспортироваться в просвет полости носа в виде sIgA. sIgA играет важную роль в иммунитете слизистой оболочки, захватывая патогены верхних дыхательных путей и предотвращая их адгезию на поверхности слизистой

оболочки [68]. Способность вызывать иммунологическую память является наиболее важной характеристикой приобретенного иммунитета, появляющейся в ходе эффективной вакцинации [69]. Появившиеся в результате иммунизации эффекторные Т-клетки мигрируют в дыхательные пути в конечном итоге превращаясь в тканевые Т-клетки памяти ( $T_{RM}$ ) [70]. Т-клетки $_{RM}$  обнаруживаются в верхних и нижних дыхательных путях, находятся в тканях и экспрессируют такие маркеры клеточной поверхности, как интегрин CD103 и лектин CD69 С-типа [71]. При повторном столкновении с антигенными патогенами Т-клетки $_{RM}$  быстро активируются и оперативно выполняют эффекторные функции, обеспечивая защиту от патогенной инфекции [72].

В верхних дыхательных путях В-клетки и  $T_{RM}$  обнаружены у человека в аденоидах и миндалинах. В нижних дыхательных путях  $T_{RM}$  и В-клетки присутствуют в нелимфоидных областях под эпителием дыхательных путей, в индуцируемой бронхоассоциированной лимфоидной ткани, а также в самих дыхательных путях [73]. Способность продуцировать антигенспецифические резидентные клетки памяти является решающим фактором в продвижении в практику мукозальных вакцин.

---

Интраназальная доставка антигенов в составе интраназальной вакцины должна наряду с индукцией системного иммунитета вызывать местный специфический иммунитет слизистой оболочки, приводящий к продукции в месте проникновения секреторного IgA и резидентных Т-клеток памяти. В ряде исследований показано, что это непростая задача. Тем не менее, в настоящее время по данным Всемирной организации здравоохранения идет разработка и испытание большого количества интраназальных вакцин. В том числе исследуется более десятка интраназальных вакцин против COVID-19. В качестве векторов используются аденовирус, живой ослабленный вирус гриппа, вирус парагриппа, живой ослабленный респираторно-синцитиальный вирус, вирус болезни Ньюкасла. Далеко не во всех случаях наблюдаются

положительные результаты [74]. В связи с этим для повышения эффективности мукозальных вакцин используют нанотехнологические подходы.

Важным фактором эффективности вакцин является обеспечение проникновения антигена в подслизистую, его биодоступность. В этих целях используют липофильные молекулы и частицы. Проблемой является объем назального введения; допустимый объем для назального введения человеку ограничен 25-250 мкл [75]. Это препятствует доставке достаточного количества антигена, снижает эффективность инъернализации и презентации антигена антиген-презентирующими клеткам, которые находятся в полости носа [76-77].

Применяется несколько молекулярных платформ для создания мукозальных вакцин. Среди них векторные вакцины и вакцины на основе мРНК и ряд других вакцин. К осени 2024 года четыре векторные интраназальные вакцины против КОВИД-19 были одобрены для использования, в том числе одна отечественная. Но во всех случаях отмечается низкая в сравнении с вакцинами для системного применения иммуногенность. Другие платформы, основанные на использовании рекомбинантных белков, пептидов, ДНК, также применяются для разработки мукозальных вакцин, но имеют тот же связанный с низкой иммуногенностью недостаток и нуждаются в применении адъювантов. В качестве адъювантов предлагается использовать липидные наночастицы, виросомы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMs) и ряд других соединений и структур [78-80].

---

Липидные наночастицы в разных вариантах представляют закрытые сферические пузырьки, состоящие из фосфолипидного бислоя амфифильных фосфолипидов, антигена и липидов-помощников (например, холестерина), демонстрирующие исключительную способность к биологическому разложению. Иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) представляют

собой самособирающиеся сферические клеткообразные структуры, состоящие из сапонинов, холестерина, фосфолипидов и антигенов. Виросома – это фосфолипидная везикула, включающая белки вирусного происхождения, позволяющие виросомам сливаться с клетками-мишенями. Более подробная характеристика и разнообразие адьювантных структур представлено в статье [81].

### Список литературы

1. Plotkin S. History of vaccination // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2014. – Vol. 111, Suppl. 34. – P. 12283-12287.
2. Vela Ramirez JE, Sharpe LA, Peppas NA. Current state and challenges in developing oral vaccines // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – Vol. 114. – P. 116-131.
3. Pasetti M.F., Simon J.K., Sztein M.B. et al. Immunology of gut mucosal vaccines // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 239, Suppl. 1. – P. 125-148.
4. Wang E.Y., Sarmadi M., Ying B. et al. Recent advances in nano- and micro-scale carrier systems for controlled delivery of vaccines // *Biomaterials.* – 2023. – Vol. 303. – P. 122345.
5. Serradell M.C., Rupil L.L., Martino R.A. et al. Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10, Suppl. 1. – P. 361.
6. Vela Ramirez J.E., Sharpe L.A., Peppas N.A. Current state and challenges in developing oral vaccines // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – Vol. 114. – P. 116-131.
7. Zimmermann P., Curtis N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2019. – Vol. 32, Suppl. 2. – P. e00084-e00118.
8. Pishesha N., Harmand T.J., Ploegh H.L. A guide to antigen processing and presentation // *Nat. Rev. Immunol.* – 2022. – Vol. 22, Suppl. 12. – P. 751-764.

9. Mukherjee A., Bisht B., Dutta S. et al. Current advances in the use of exosomes, liposomes, and bioengineered hybrid nanovesicles in cancer detection and therapy // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2022. – Vol. 43, Suppl. 11. – P. 2759-2776.
10. Mörbe U.M., Jørgensen P.B., Fenton T.M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function // *Mucosal Immunol.* – 2021. – Vol. 14, Suppl. 4. – P. 793-802.
11. Zhao H., Zhou X., Zhou Y.H. Hepatitis B vaccine development and implementation // *Hum. Vaccin Immunother.* – 2020. – Vol. 16, Suppl. 7. – P. 1533-1544.
12. Möller J., Kraner M.E., Burkovski A. More than a Toxin: Protein Inventory of *Clostridium tetani* Toxoid Vaccines // *Proteomes.* – 2019. – Vol. 7, Suppl. 2. – P. 15.
13. Abulmagd S., Khattab A.E.A., Zedan H. Expression of full and fragment-B of diphtheria toxin genes in *Escherichia coli* for generating of recombinant diphtheria vaccines // *Clin. Exp. Vaccine Res.* – 2022. – Vol. 11, Suppl. 1. – P. 12-29.
14. Chokeybulkit K., Puthanakit T., Bhat N. et al. A phase 2 randomized controlled dose-ranging trial of recombinant pertussis booster vaccines containing genetically inactivated pertussis toxin in women of childbearing age // *Vaccine.* – 2022. – Vol. 40, Suppl. 15. – P. 2352-2361.
15. Mouro V., Fischer A. Dealing with a mucosal viral pandemic: lessons from COVID-19 vaccines // *Mucosal Immunol.* – 2022. – Vol. 15, Suppl. 4. – P. 584-594.
16. Verma S.K., Mahajan P., Singh N.K et al. New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1043109.
17. Clements J.D., Norton E.B. The Mucosal Vaccine Adjuvant LT(R192G/L211A) or dmLT // *mSphere.* – 2018. – Vol. 3, Suppl. 4. – P. e00215-e00218.

18. Pulendran B., Arunachalam P.S., O'Hagan D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2021. – Vol. 20, Suppl. 6. – P. 454-475.
19. Heim J.B., Hodnik V., Heggelund J.E. et al. Crystal structures of cholera toxin in complex with fucosylated receptors point to importance of secondary binding site // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 12243.
20. Delafresnaye L., Feist F., Hooker J.P. et al. Microspheres from light-a sustainable materials platform // *Nat. Commun.* – 2022. – Vol. 13, Suppl. 1. – P. 5132.
21. Welling M.M., Duszenko N., van Meerbeek M.P. et al. Microspheres as a Carrier System for Therapeutic Embolization Procedures: Achievements and Advances // *J. Clin. Med.* – 2023. – Vol. 12, Suppl. 3. – P. 918.
22. Betancor M., Moreno-Martínez L., López-Pérez Ó. et al. Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease // *Mol. Neurobiol.* – 2021. – Vol. 58, Suppl. 10. – P. 5312-5326.
23. Yun S.O., Shin H.Y., Kang C.Y. et al. Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes with activated B cells // *Cytherapy.* – 2017. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. 119-127.
24. Porter D.C., Ansardi D.C., Morrow C.D. Encapsidation of poliovirus replicons encoding the complete human immunodeficiency virus type 1 gag gene by using a complementation system which provides the P1 capsid protein in trans // *J. Virol.* – 1995. – Vol. 69, Suppl. 3. – P. 1548-1555.
25. Sharpe S., Fooks A., Lee J. et al. Single oral immunization with replication deficient recombinant adenovirus elicits long-lived transgene-specific cellular and humoral immune responses // *Virology.* – 2002. – Vol. 293, Suppl. 2. – P. 210-216.
26. Langridge W.H. Edible vaccines // *Sci Am.* – 2000. – Vol. 283, Suppl. 3. – P. 66-71.

27. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1992. – Vol. 89, Suppl. 24. – P. 11745-11749.
28. Liu Y., Lam D.M., Luan M. et al. Recent development of oral vaccines (Review) // *Exp. Ther. Med.* – 2024. – Vol. 27, Suppl. 5. – P. 223.
29. Wen S.X., Teel L.D., Judge N.A. et al. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Med.* – 2006. – Vol. 103, Suppl. 18. – P. 7082-7087.
30. Arakawa T., Chong D.K., Langridge W.H. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine // *Nat. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 16, Suppl. 3. – P. 292-297.
31. Greco R., Michel M., Guetard D. et al. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25, Suppl. 49. – P. 8228-8240.
32. Mehrizadeh V., Dorani E., Mohammadi S.A. et al. Expression of recombinant human IFN- $\gamma$  protein in soybean (*Glycine max L.*) // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2021. – Vol. 146. – P. 127-136.
33. Ren C., Zhang Q., Wang G. et al. Modulation of peanut-induced allergic immune responses by oral lactic acid bacteria-based vaccines in mice // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 98, Suppl. 14. – P. 6353-6364.
34. Joh L.D., Wroblewski T., Ewing N.N. et al. High-level transient expression of recombinant protein in lettuce // *Biotechnol. Bioeng.* – 2005. – Vol. 91, Suppl. 7. – P. 861-871.
35. Luchakivskaya Y., Kishchenko O., Gerasymenko I. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota L.*) plants // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30, Suppl. 3. – P. 407-415.
36. Beihaghi M., Marashi H., Bagheri A. et al. Transient expression of CCL21 as recombinant protein in tomato // *Biotechnol. Rep (Amst).* – 2017. – Vol. 17. – P. 10-15.

37. Lee R.W., Strommer J., Hodgins D. et al. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein // *Infect Immun.* – 2001. – Vol. 69, Suppl. 9. – P. 5786-5793.
38. Pérez Aguirreburualde M.S., Gómez M.C., Ostachuk A. et al. Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2013. – Vol. 151, Suppl. 3-4. – P. 315-324.
39. Streatfield S.J., Lane J.R., Brooks C.A. et al. Corn as a production system for human and animal vaccines // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21, Suppl. 7-8. – P. 812-815.
40. Wee S., Gombotz W.R. Protein release from alginate matrices // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1998. – Vol. 31, Suppl. 3. – P. 267-285.
41. Ma Y., Lin S.Q., Gao Y. et al. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 9, Suppl. 10. – P. 2211-2215
42. Díaz-Dinamarca D.A., Salazar M.L., Castillo B.N. Protein-Based Adjuvants for Vaccines as Immunomodulators of the Innate and Adaptive Immune Response: Current Knowledge, Challenges, and Future Opportunities // *Pharmaceutics.* – 2022. – Vol. 14, Suppl. 8. – P. 1671.
43. Jan N., Shafi F., Hameed Ob. et al. Overview on Edible Vaccines and Immunization // *Austin J. Nutri Food Sci.* – 2016. – Vol. 4, Suppl. 2. – P. 1078.
44. Zhang X., Buehner N.A., Hutson A.M. et al. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein // *Plant. Biotechnol. J.* – 2006. – Vol. 4, Suppl. 4. – P. 419-432.
45. McGarvey P.B., Hammond J., Dienelt M.M. et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes // *Biotechnology (NY).* – 1995. – Vol. 13, Suppl. 13. – P. 1484-1487.

46. Jain A., Saini V., Kohli D.V. Edible transgenic plant vaccines for different diseases tomatoes // *Curr. Pharm Bio Technol.* – 2013. – Vol. 14, Suppl. 6. – P. 594-614.
47. Chan H.T., Daniell H. Plant-made oral vaccines against human infectious diseases-Are we there yet? // *Plant Biotechnol. J.* – 2015. – Vol. 13, Suppl. 8. – P. 1056-1070.
48. Rao J.P., Agrawal P., Mohammad R. et al. Expression of VP1 protein of serotype A and O of foot-and-mouth disease virus in transgenic sunnhemp plants and its immunogenicity for guinea pigs // *Acta. Virol.* – 2012. – Vol. 56, Suppl. 2. – P. 91-99.
49. Rogers A.W.L., Tsohis R.M., Bäumlér A.J. *Salmonella* versus the Microbiome // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2020. – Vol. 85, Suppl. 1. – P. e00027-e00119.
50. Surridge C. Oral vaccines: Papaya salad // *Nat. Plants.* – 2017. – Vol. 3. – P. 17034.
51. Azad M.A., Rabbani M.G., Amin L. et al. Development of Transgenic Papaya through *Agrobacterium*-Mediated Transformation // *Int. J. Genomics.* – 2013. – P. 235487.
52. Stöger E., Vaquero C., Torres E. et al. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 42, Suppl. 4. – P. 583-590.
53. Specht E.A., Mayfield S.P. Algae-based oral recombinant vaccines // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 60.
54. Sami N., Ahmad R., Fatma T. Exploring algae and cyanobacteria as a promising natural source of antiviral drug against SARS-CoV-2 // *Biomed. J.* – 2021. – Vol. 44, Suppl. 1. – P. 54-62.
55. Satyaraj E., Reynolds A., Engler R. et al. Supplementation of Diets With *Spirulina* Influences Immune and Gut Function in Dogs // *Front. Nutr.* – 2021. – Vol. 8. – P. 667072.

56. Gebre M.S., Brito L.A., Tostanoski L.H. et al. Novel approaches for vaccine development // *Cell*. – 2021. – Vol. 184, Suppl. 6. – P. 1589-1603.
57. Chan B.C., Li P., Tsang M.S. et al. Creating a Vaccine-like Supplement against Respiratory Infection Using Recombinant *Bacillus subtilis* Spores Expressing SARS-CoV-2 Spike Protein with Natural Products // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28, Suppl. 13. – P. 4996.
58. Soutter F., Werling D., Nolan M. et al. A Novel Whole Yeast-Based Subunit Oral Vaccine Against *Eimeria tenella* in Chickens // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 809711.
59. Beule A.G. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses // *GMS Curr. Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* – 2010. – Vol. 9. – P. Doc07.
60. Pabst R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)-Structure, function and species differences // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33, Suppl. 36. – P. 4406-4413.
61. Van der Ley P.A., Zariri A., van Riet E. et al. An Intranasal OMV-Based Vaccine Induces High Mucosal and Systemic Protecting Immunity Against a SARS-CoV-2 Infection // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 781280.
62. Mao T., Israelow B., Peña-Hernández M.A. et al. Unadjuvanted intranasal spike vaccine elicits protective mucosal immunity against sarbecoviruses // *Science*. – 2022. – Vol. 378, Suppl. 6622. – P. eabo2523.
63. Brandtzaeg P. Immune functions of nasopharyngeal lymphoid tissue // *Adv. Otorhinolaryngol.* – 2011. – Vol. 72. – P. 20-24.
64. Dunne P.J., Moran B., Cummins R.C. et al. CD11c+CD8alpha+ dendritic cells promote protective immunity to respiratory infection with *Bordetella pertussis* // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 183, Suppl. 1. – P. 400-410.
65. Kiyono H., Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 4, Suppl. 9. – P. 699-710.

66. Moens L., Tangye S.G. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 65.
67. Wei H., Wang J.Y. Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in IgA and IgM Transcytosis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, Suppl. 5. – P. 2284.
68. Lund F.E., Randall T.D. Scent of a vaccine // *Science.* – 2021. – Vol. 373, Suppl. 6553. – P. 397-399.
69. Kok L., Masopust D., Schumacher T.N. The precursors of CD8<sup>+</sup> tissue resident memory T cells: from lymphoid organs to infected tissues // *Nat. Rev. Immunol.* – 2022. – Vol. 22, Suppl. 5. – P. 283-293.
70. Rahimi R.A., Luster A.D. Chemokines: Critical Regulators of Memory T Cell Development, Maintenance, and Function // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 138. – P. 71-98.
71. Lee C.M., Oh J.E. Resident Memory B Cells in Barrier Tissues // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 953088.
72. Zheng M.Z.M., Wakim L.M. Tissue resident memory T cells in the respiratory tract // *Mucosal Immunol.* – 2022. – Vol. 15, Suppl. 3. – P. 379-388.
73. Bai Z., Wan D., Lan T. et al. Nanoplatfrom Based Intranasal Vaccines: Current Progress and Clinical Challenges // *ACS Nano.* – 2024. – Vol. 18, Suppl. 36. – P. 24650-24681.
74. Pires A., Fortuna A., Alves G. et al. Intranasal drug delivery: how, why and what for? // *J. Pharm Pharm Sci.* – 2009. – Vol. 12, Suppl. 3. – P. 288-311.
75. Napolioni V., MacMurray J. Infectious diseases, IL6 -174G>C polymorphism, and human development // *Brain Behav Immun.* – 2016. – Vol. 51. – P. 196-203.
76. Marasini N., Skwarczynski M., Toth I. Intranasal delivery of nanoparticle-based vaccines // *Ther. Deliv.* – 2017. – Vol. 8, Suppl. 3. – P. 151-167.

77. Carter N.J., Curran M.P. Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz™): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults // *Drugs*. – 2011. – Vol. 71, Suppl. 12. – P. 1591-622.
78. Waltz E. China and India approve nasal COVID vaccines - are they a game changer? // *Nature*. – 2022. – Vol. 609, Suppl. 7927. – P. 450.
79. Zhu F., Zhuang C., Chu K. et al. Safety and immunogenicity of a live-attenuated influenza virus vector-based intranasal SARS-CoV-2 vaccine in adults: randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials // *Lancet Respir. Med.* – 2022. – Vol. 10, Suppl. 8. – P. 749-760.
80. Bai Z., Wan D., Lan T. et al. Nanoplatfom Based Intranasal Vaccines: Current Progress and Clinical Challenges trials // *ACS Nano*. – 2024. – Vol. 18, Suppl. 36. – P. 24650-24681.

## Биоконъюгированные вакцины

Вакцины, полученные путем объединения в одну структуру белковой и углеводной составляющих антигена, - одни из наиболее распространенных и надежных профилактических препаратов, созданных человеком для борьбы с массовыми инфекциями. Они не только позволяют значительно снижать заболеваемость и смертность, вызываемые патогенными микроорганизмами, но и помогают бороться с распространением антибиотико-резистентных штаммов возбудителей, которые создают серьезные угрозы здравоохранению.

Концепция комбинированного препарата, сочетающего в себе компоненты различной природы, появилась в связи с тем, что ранние вакцины, созданные на базе чисто углеводных соединений, оказались малоэффективны. Они активировали В-клетки, вызывали выработку низкоаффинных и короткоживущих антител класса М, но практически не затрагивали Т-клетки и не приводили к формированию долгосрочного защитного ответа (1). Кроме того, ввиду особенностей иммунной системы детей раннего возраста, полисахаридные вакцины оказались практически бесполезны для их защиты, хотя именно дети являются наиболее уязвимой для подобных инфекций категорией. Убедившись в этом, исследователи решили объединить полисахариды с белковым компонентом, который в этом тандеме служил источником эпитопов, распознаваемых Т-клетками, и тем самым давал возможность задействовать не только В-клеточный ответ. Идея оказалась чрезвычайно плодотворной, и в настоящий момент в мире существует целый ряд эффективных и надежных препаратов, защищающих от менингококков, пневмококков, гемофильной инфекции, тифа и др. (2-7). Вместе с тем производство конъюгированных вакцин весьма громоздкое, затратное, состоит из многих этапов и сопровождается потерями практически на каждом из них, так что итоговый выход готового препарата оказывается заниженным. Все это не может не сказываться на стоимости продукта, что мешает широкому распространению гликоконъюгированных вакцин, которые

особенно необходимы в самых бедных и малоразвитых странах, где условия жизни и уровень санитарии оставляют желать лучшего. Кроме того, даже весьма эффективные вакцины, такие как 23-валентная Превнар 23 (PPV23), заведомо не включают в свой состав эпитопы всех известных на настоящий момент серотипов возбудителя, поскольку число их достигло уже сотни (8). Вакцины требуют регулярного улучшения, но многоэтапный и нуждающийся в постоянном контроле производственный процесс сильно усложняет дальнейшее совершенствование.

В связи с вышеизложенным чрезвычайно актуальными являются работы в области совершенствования методов получения уже имеющихся и разработки новых полисахаридных конъюгированных вакцин (ПКВ). Одним из таких новых направлений является метод биологической конъюгации или **технология рекомбинантного бактериального гликозилирования** (англ. Protein glycan coupling technology, PGCT). Данный метод дает возможность получать иммуногенные гликоконъюгаты непосредственно в клетках бактерий, чаще всего *E. coli*, используя генетические модификации, сходные с теми, которые уже давно применяются при производстве рекомбинантных белков и пептидов. Дополнительные манипуляции, которые применяются сейчас при химической конъюгации предварительно полученных полисахаридов и белковых составляющих, в этом случае становятся ненужными. Основу метода составляет перенос необходимых для этого генетических кластеров в организм бактерии-продуцента, где и происходит как синтез всех необходимых компонентов, так и конечная сборка их в готовый продукт с помощью открытых в последние десятилетия процессов бактериального гликозилирования белков.

Длительное время считалось, что гликозилирование белков является характерным признаком эукариотических организмов и архей. Однако в последние десятилетия было обнаружено значительное число самых разнообразных видов бактерий, которые тоже осуществляют подобные процессы, хотя и, разумеется, со значительными оговорками. Пионерной здесь

оказалась работа Szymanski et al. (9), где в ходе исследования локуса патогенной  $\epsilon$ -протеобактерии *Campylobacter jejuni*, предположительно кодирующего гены биосинтеза липоолигосахарида (ЛОС), было обнаружено, что на самом деле мутации в участке с 81 по 176 приводили к нарушению связывания белков *C. jejuni* с антителами сывороток как кролика, так и человека. В дальнейшем было выяснено, что состоящий из 17 000 п.о. кластер содержит целую группу генов, кодирующих белки, наиболее важным из которых является олигосахарилтрансфераза (ОСТ), способная осуществлять N-гликозилирование белков по типу эукариот, хотя и с существенными различиями. Кластер получил название *pgl* (от англ. «**p**rotein **g**lycosylation»), белок, соответственно, - PglB. Помимо него, *C. jejuni* оказался способен экспрессировать целый ряд белков, участвующих в синтезе полисахаридных цепей как липоолигосахарида и капсульных углеводов, так и O- и N-гликозилированных пептидов, так что гликозилирование является существенным моментом в метаболизме этого патогена (10).

Дальнейшие исследования показали, что гликозилирование с помощью PglB происходит по определенной акцепторной последовательности Asp/Glu - Y - Asn - X - Ser/Tre (D/EYNXS/T), где Y и X - любые аминокислоты, кроме пролина (11). Это делает PglB более требовательным к акцептору, чем стандартные эукариотические ОСТ, для которых аналогичная последовательность составляет Asn - X - Ser/Tre (NXS/T). Тем не менее в обоих случаях гликозилирование идет по остатку аспарагина, то есть, осуществляется по типу N-гликозилирования. Также было показано, что вся последовательность, входящая в кластер *pgl*, является высококонсервативной (12).

Однако самым важным моментом в изучении свойств *C. jejuni* стало то, что кластер генов *pgl* оказалось возможным перенести в *E. coli*, где в присутствии рекомбинантных белков-акцепторов, характерных для *C. jejuni* и также клонированных вместе с локусом *pgl*, были получены гликозилированные формы (13). Это открыло новые возможности в



исследования *in vitro*, а также анализ экспрессии кластера, клонированного в *E. coli*, позволили выяснить функции каждого гена (14-17).

Структура конечного гликана, синтезируемого в результате работы ферментов кластера *rgl*, была выяснена с помощью ЯМР и масс-спектрометрии (18). Это гептасахарид, состоящий из GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-(Glc $\alpha$ 1,3-)GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,3-BaC-1,N-Asn, где GalNAc - N-ацетилгалактозамин, Glc - глюкоза, BaC - бациллозамин (2,4-диацетамидо-2,4,6-тридеоксиглюкоза), Asn - остаток аспарагина. Липидный якорь, на котором начинается сборка гептасахаридов, - ундекапренолпирофосфат (УДППФ). Первым синтезируется BaC путем последовательных трансформаций из уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc) с помощью ферментов PglF (дегидратаза), PglE (аминотрансфераза) и PglD (ацетилтрансфераза), процесс проходит в цитоплазме бактериальной клетки (19-24). Затем фермент PglC прикрепляет остаток BaC к УДКПФ на внутренней стороне клеточной мембраны, после чего к нему начинают присоединяться нуклеотид-активированные сахара. Катализируют этот процесс 4 гликозилтрансферазы:

во-первых, PglA добавляет остаток  $\alpha$ 1,3-GalNAc непосредственно к остатку BaC,

во-вторых, ферменты PglH и PglJ присоединяют еще 4  $\alpha$ 1,4-GalNAc, причем PglH катализирует присоединение первого, а PglJ - оставшихся трех,

в-третьих, гликозилтрансфераза PglI добавляет боковое ответвление  $\alpha$ 1,3Glc

Последний из кодируемых локусом *rgl* ферментов, PglG, пока недостаточно изучен, функция его неясна.

После сборки гептасахарид переносится на периплазматическую сторону мембраны с помощью фермента флипазы - АТФ-зависимого кассетного транспортера, также называемого PglK (25). Необходимость в таком переносе возникает по двум причинам: во-первых, гликозилируемые белки в

большинстве своем секретируются, а во-вторых, ключевой фермент цикла, PglB, находится на периплазматической стороне мембраны (26-27). Этот процесс очень напоминает аналогичный перенос, происходящий при синтезе капсульных полисахаридов и липополисахарида *C. jejuni*, или тот, что имеет место при N-гликозилировании у эукариот, где собранные полисахариды переносятся из цитоплазмы в люмен ЭПР. Таким образом, периплазматическое пространство бактерий выступает функциональным аналогом люмена ЭПР эукариотических клеток. ОСТ PglB, осуществляющая конечный перенос синтезированного гептасахарида на аспарагиновый остаток белков, также проявляет значительное сходство в строении с STT3-субъединицей N-олигосахарилтрансферазного комплекса *Saccharomyces cerevisiae*, который встречается в том числе у архей, в частности, термофильной *Pyrococcus furiosus* (26-28). После финальной сборки и переноса готовый гептасахарид присоединяется по акцепторной последовательности на белки-носители, при этом потеря бокового ответвления в виде глюкозного остатка не влияет на способность к присоединению, тогда как не до конца собранная основная цепочка PglB не воспринимается (16).

Наиболее изученным на настоящий момент является PglB вида *Campylobacter lari* (ClPglB). В 2011 г. Lizak et al. выяснили подробную структуру полного ClPglB, оказалось, что он на 56% идентичен PglB из *C. jejuni* (CjPglB) и способен выполнять его функции при условии коэкспрессирования с локусом *pgl* (29). Подтвердилось наличие двух доменов, периплазматического (аминокислоты с 433 по 712) и трансмембранного (аминокислоты с 1 по 432). Помимо ковалентных, домены также связаны нековалентными взаимодействиями за счет расширенной периплазматической петли 1 (EL1). Периплазматический домен содержит  $\alpha\beta$ -структуры, как было показано ранее для CjPglB и его аналога из *Pyrococcus furiosus* (26,30). Трансмембранный домен содержит 13 пронизывающих мембрану сегментов, соединенных короткими цитоплазматическими и внешними петлями, не

считая длинных петель EL1 и EL5. Сайт связывания акцепторной последовательности и каталитический сайт сформированы трансмембранными сегментами ТМ 1-4 и ТМ 10-13, которые также обеспечивают взаимодействие с периплазматическим доменом. Когда С1РglВ связан с акцепторным белком, над мембранной поверхностью формируются два «кармана»: левый - для пептида, а правый, исходя из присутствия аминокислотных остатков, необходимых для катализа, - для липид-связанного полисахарида. Присоединение аспарагина объединяет оба «кармана» в единое пространство. Поскольку активные «карманы» не в состоянии вместить весь гликозилируемый белок, предполагается, что акцепторная последовательность должна представляться С1РglВ на выступающей гибкой длинной петле (29). Это объясняет невозможность гликозировать белки, содержащие в акцепторной последовательности ригидный остаток пролина.

Предложенная модель структуры С1РglВ объясняет также необходимость в остатках серина или треонина в положении +2 акцепторной последовательности, поскольку  $\beta$ -гидроксильная группа создает 3 водородные связи с каждым из боковых остатков участка W463, W464 и D465, что позволяет дистанцировать серин/треонин в этом положении от активного аспарагинового остатка и дополнительно подтверждает факт неучастия его в непосредственном образовании связи с липоолигосахаридом. При этом отмечается, что наличие треонина в +2 положении приводит к 40-кратному увеличению эффективности гликозирования по сравнению с наличием серина, за счет ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с остатком I572 в консервативном фрагменте MXXI в С1РglВ. В предыдущих работах было показано, что гликозирование проходит успешнее при наличии отрицательно заряженного остатка в -2 позиции, т.е. там должны располагаться аспарагиновая или глутаминовая кислоты, что позволяет создать солевой мостик с остатком R331 в С1РglВ, усиливая связь фермента и белка-акцептора (31). Следует заметить, что поскольку фрагменты с остатками I572 и R331

консервативны только у бактерий, акцепторная последовательность у эукариот короче.

Активность ClPglB зависит от присутствия в среде двухвалентных ионов  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$  (32). Каталитический «карман» ClPglB содержит три остатка с боковыми кислотными цепями, D56, D154 и E319, которые, предположительно, стабилизируют двухвалентный катион. D156 и D154 входят в уже охарактеризованный мотив DXD и являются существенными для катализа (33), при наличии мутации по какому-либо из них фермент теряет активность (34). С другой стороны, остатки D56 и E319, предположительно, в катализе не участвуют, скорее их карбоксильные группы взаимодействуют с двухвалентным катионом, и с амидным остатком аспарагина, стабилизируя их положение. Показано, что отрицательные заряды карбоксигрупп аспарагиновой и глутаминовой кислот очень важны для поддержания активности ClPglB (35).

Основываясь на описанной выше структуре, Lizak et al. предположили следующий трехэтапный механизм гликозилирования:

- реакция начинается со связывания акцепторной последовательности с ClPglB. За связывание отвечает петля EL5, которая стабилизирует и фиксирует положение белка-акцептора напротив периплазматического домена ClPglB

- остаток E319 находится на цепи EL5, поэтому связывание завершается формированием каталитического сайта, где аспарагин ориентирован в нужном направлении и экранирован от посторонних воздействий

- в финале активированная амидная группа аспарагина подвергается нуклеофильной атаке и ковалентно связывается с липид-связанным олигосахаридом, т.е. гликозилируется.

Прояснение структуры основного фермента N-гликозилирования по типу *C. lari* позволило существенно продвинуться в изучении этого процесса, поскольку известно, что у PglB есть ряд характерных черт, накладывающих серьезные ограничения на дальнейшее применение его в биотехнологии.

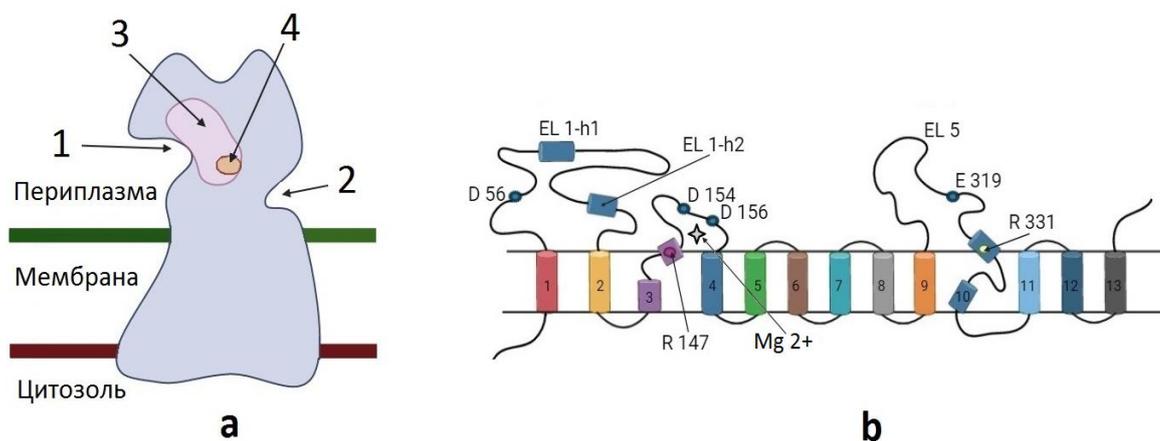


Рис. 2 Схематическое изображение структуры *Campylobacter lari* PglB [29, с изменениями]. «а» - общий вид CIPglB, где 1 - сайт связывания акцепторной последовательности белка или пептида, 2 - сайт связывания липид-ассоциированного олигосахарида (каталитический сайт), 3 - гликозилируемый белок, 4 - акцепторный остаток аспарагина; «б» - топологическая схема, иллюстрирующая размещение спирализованных участков и соединяющих петель (EL1 и EL5). Помимо них, отмечены активные аминокислотные остатки (D56, D154, D156, R147, R331, E319).

Самое существенное из них - PglB способен присоединять только гликаны с редуцирующим концевым сахарным остатком по ацетамидной группе во 2 положении (36). К примеру, такие сахара были обнаружены в *E. coli*, *C. jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* и *Francisella tularensis*, но в *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus suis* и *Actinobacillus pleuropneumoniae* такие модификации отсутствуют. Кроме того, углеводный состав гликанов, которые способен переносить PglB, ограничен и не всегда соответствует запросам исследователя. С другой стороны, четкая привязанность к определенной акцепторной последовательности на гликозилируемом белке делает PglB очень удобным для использования в случае рекомбинантных белков-носителей, в которые генно-инженерным способом вносится необходимый для гликозилирования участок. Особенностью именно CIPglB в этом отношении является относительно большая гибкость, так как в другом исследовании от 2011 г. была показана его способность гликозилировать по сайтам DANSG и NNNST (37). Исходя из

этого, можно предполагать, что аналоги PglB из других микроорганизмов также могут обладать некоторыми различиями в свойствах, что можно будет использовать при разработке новых методов гликозилирования.

В целом биологическая роль N-гликозилирования в метаболизме *C. jejuni* пока еще неясна, но ввиду того, какой значительный процент генома бактерии занимают гены, кодирующие гликозилирующие ферменты, а также высокой консервативности этого локуса среди остальных представителей  $\epsilon$ -протеобактерий, функция его должна быть очень значимой. Поскольку подавляющее большинство гликозилируемых белков *C. jejuni* секретируются в периплазматическое пространство, основными функциями N-гликозилирования, видимо, являются защита белков от протеолитического расщепления, повышение их стабильности и сигналы для клеточной сортировки, аналогично таковым у эукариот (38; 39).

#### N-гликозилирование у других видов бактерий

Дальнейшие исследования показали, что *C. jejuni* - не единственный представитель, способный осуществлять N-гликозилирование. Секвенирование геномов выявило, что схожие с кластером *pgl* структуры имеются и у *Campylobacter coli* RM2228, *Campylobacter lari* RM2100, *Campylobacter upsaliensis* RM3195. Все секвенированные геномы содержали последовательность, кодирующую ключевой фермент, ОСТ PglB, в которой имелся консервативный каталитический домен WWDYG (13). Ключевые особенности белков этих микроорганизмов были уже рассмотрены выше.

Baar et al. в 2003 г. обнаружили в родственной  $\epsilon$ -протеобактерии *Wolinella succinogenes* сходный с кампилобактерным кластер *pgl*, который также поддавался переносу в *E. coli* (40). Причем несмотря на определенные различия в наборе кодируемых кластером генов, при совместном клонировании кластера *pgl* из *W. succinogenes* и набора акцепторных белков из *C. jejuni* в *E. coli* были получены гликозилированные белки, то есть ферменты *W.*

*succinogenes* распознавали акцепторные последовательности на белках из *C. jejuni*, хотя эффективность такого гликозилирования была низкой (41).

Еще одним представителем  $\epsilon$ -протеобактерий, для которого была показана способность к N-гликозилированию, является род *Helicobacter*. Два вида, *Helicobacter canadiensis* и *Helicobacter pullorum*, оказались обладателями сразу двух ортологов PglB (41), которые с большой вероятностью могут отличаться по специфичности от CjPglB. Исследования геномов этих двух родственных бактерий показали, что в них содержатся все те же гены, которые необходимы для осуществления N-гликозилирования и входят в кластер *pgl*, хотя здесь они расположены не в одном локусе, а в трех разных. Кроме того, согласно работе Jervis et al. (42), были зафиксированы отличия в распознаваемой акцепторной последовательности от фермента из *C. jejuni*, поскольку часть из гликозилированных CjPglB аспарагиновых остатков PglB из *Helicobacter pullorum* не распознал. Тем не менее при переносе в *E.coli* HpPglB продемонстрировал способность присоединять гликаны *C. jejuni*.

Ортолог PglB был обнаружен также в  $\delta$ -протеобактерии *Desulfovibrio desulfuricans* (43). Белок был клонирован в *E.coli* и продемонстрировал способность переносить гептасахариды *C. jejuni*. Для него была показана более короткая, схожая с эукариотической акцепторная последовательность NXS/T и расширенный список переносимых гликанов, среди которых авторы отметили 2,4-диацетамидо-2,4,6-тридеоксигексозу DATDH и O7 O-антиген *E.coli*.

Метагеномное секвенирование показало наличие PglB также в менее изученных видах. Ортологи PglB были обнаружены в  $\epsilon$ -протеобактериях, населяющих глубоководные термальные источники (в том числе т. наз. «черные курильщики»), - *Nitratiruptor tergaricus* и *Sulfurovum lithrotrophicum*. Локусы, окружающие PglB, в этих бактериях весьма отличаются от входящих в кластер *pgl* у *C. jejuni*, однако содержат ортологи ферментов, участвующих в биосинтезе полисахаридов (44). Учитывая, что бактериальная микрофлора подводных гидротермальных источников в значительной степени состоит из

ε-протеобактерий, распространенность бактериального N-гликозилирования может быть куда большей, чем предполагалось прежде. Кроме того, наличие подобных систем у обитателей морского дна опровергает тезис о патогенной природе данного процесса, по-видимому, это очень древняя, даже рудиментарная система, распространенная среди обитателей самых разных экологических ниш (45).

Помимо N-гликозилирования, бактерии обладают способностью присоединять углеводные остатки через O-связь к остаткам серина или треонина, т.е. посредством O-гликозилирования. В большинстве случаев эти остатки представляют собой мономерные сахара, присоединяемые поодиночке к белкам поверхностных структур, используя нуклеотид-активированные доноры (46). Однако для некоторых представителей показана способность переносить и более сложные O-связанные гликаны. Такими свойствами обладают, например, *P. aeruginosa* (47), *N.meningitides* (48), *F.tularensis* (49), *Acinetobacter baylyi* (50).

В случае *P. aeruginosa* функции OСТ выполняет фермент PilO, который переносит гликаны на белок PilA (пилин IV типа) (47). Для него была показана акцепторная последовательность из 14 аминокислот, расположенная на C-конце (51).

*F. tularensis* содержит фермент PglA, также являющийся олигосахарилтрансферазой и осуществляющий присоединение пентасахаридов к белку PilA (49).

*N. meningitides* экспрессирует белок PglL, кодируемый геном pglL, мутация в котором приводит к синтезу некорректных пилинов (52). Консенсусная последовательность этого фермента состоит из 8 аминокислот (51).

Фермент PglS из *A. baylyi* - O-гликозилтрансфераза, переносящая углеводные остатки на пилиноподобный белок ComP (50).

Все перечисленные белки при клонировании в *E.coli* продемонстрировали способность гликозилировать свои нативные субстраты, при условии

одновременного клонирования кодирующих их генов и наличия в клетке-хозяине подходящих гликанов для переноса (53). Причем если PiiO переносил только короткие олигосахариды, то PglL осуществлял гликозилирование довольно длинными полисахаридами, схожими с субстратами для CjPglB, а кроме того, взаимодействовал с обширным перечнем гликанов, в том числе и с такими, которые недоступны для CjPglB, например, O4 O-антигеном *S.typhimurium*. Относительно PglS было выяснено, что он способен переносить олигосахариды с редуцирующим концевым сахаром, что также может быть использовано в PGCT (54-55).

Еще одна разновидность бактериальных систем гликозилирования была обнаружена при исследовании адгезинов Грам-отрицательной  $\gamma$ -протеобактерии нетипируемой *H. influenzae*. Grass et al. в 2003 г. показали, что адгезины HMW1 и HMW2 являются N-гликозилированными белками (56). Учитывая, что почти 80% нетипируемых *H. influenzae* экспрессируют белки HMW1 и HMW2, являющиеся крайне существенными для адгезии на поверхности клеток респираторных путей человека и последующей колонизации (57-58), распространенность N-гликозилирования в этой группе бактерий представляется значительной. В дальнейшем было показано, что гликозилирование не только привносит почти 5% массы всего пула HMW1 и HMW2, но и затрагивает ключевые моменты в функционировании адгезинов, так как негликозилированный HMW1 не фиксировался на поверхности бактерии (56). Ключевым ферментом в гликозилировании HMW1 оказался белок HMW1C, который формирует комплекс с белком-акцептором в цитоплазме и переносит углеводный остаток на аспарагин с нуклеотид-активированного сахара, осуществляя таким образом отличный от предыдущих тип N-гликозилирования, не связанный с мембранными структурами и без участия липидов как переносчиков гликанов (56). Кроме того, было выяснено, что HMW1C сочетает в себе сразу 2 функции: N-гликозилирование белка-акцептора по остатку аспарагина, причем с уклоном в сторону длинных полипептидов, и O-гликозилирование по атому кислорода

уже углеводного остатка с образованием гексоз-гексозной связи (56; 37). Исследования с помощью масс-спектрометрии показали, что гликозилирование НМW1 проходит по аспарагиновому остатку по 31 сайту, 47 неацетилированными гексозами или дигексозами, что нетипично как для про-, так и эукариот, поскольку используются обычно ацетилированные сахара (59). Акцепторная последовательность в подавляющем большинстве сайтов была идентична эукариотической - NXS/T.

Сходные с НМW1С ферменты были обнаружены и в других микроорганизмах, включая *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus ducreyi*, *Burkholderia spp*, *A. pleuropneumonia*. Фермент *A. pleuropneumonia*, ApНМW1С, оказался на 65% идентичен исходному НМW1С и при клонировании в *H.ingluenzae* продемонстрировал способность компенсировать удаление гена hmw1С (60). Это семейство ферментов получило название NGT - цитоплазматические N-гликозилтрансферазы - и рассматривается как перспективное в рамках дальнейшего развития PGCT.

PGCT подразумевает наличие трех основных компонентов - белка-акцептора, переносимого полисахарида и фермента, осуществляющего этот перенос. Помимо того, существенное влияние на конечный результат оказывает организм клетки-хозяина, где происходит ферментативная реакция. В зависимости от необходимости, различным модификациям и улучшениям могут быть подвергнуты все эти компоненты.

Одним из важных достижений, полученных в ходе исследования бактериального гликозилирования, было установление консенсусных последовательностей в полипептидных цепочках акцепторных белков, по которым избирательно происходит присоединение полисахаридов. Естественным образом сразу возник вопрос - а можно ли, используя эти последовательности, модифицировать белки, нативными акцепторами ОСТ не являющиеся, но нуждающиеся в гликозилировании для выполнения своих функций? Впервые такая попытка была сделана в 2006 г. (31), акцепторная

последовательность D/EYNXS/T была внедрена в гибкую петлю холерного токсина В, и СjPglV ее распознал и гликозилировал белок. Дальнейшие исследования в этой области привели к созданию так называемых «гликотэгов» - повторяющихся коротких фрагментов, состоящих из оптимизированных акцепторных последовательностей, генетически внедренных в структуру гликозилируемого белка для того, чтобы его мог распознать СjPglV или другие ОСТ (61). Это добавило преимуществ новым методам создания гликоконъюгированных вакцин, поскольку сильно расширяло спектр потенциальных белков-носителей. Разумеется, внедрение гликотэгов имеет свои ограничения - так, последовательности должны располагаться на достаточно гибкой и свободной петле, чтобы быть доступными для ОСТ, сами белки-акцепторы должны находиться в периплазматической области, а после гликозилирования по возможности секретироваться во внешнюю среду (61). Тем не менее, возможность путем относительно простых генетических манипуляций получить оптимальный белок-носитель с заданными свойствами очень вдохновляет исследователей. В частности, технология гликотэгов теоретически дает возможность создавать вакцины «двойного действия», когда и углеводная, и белковая компоненты происходят из одного и того же патогена, причем белок при этом может быть высококонсервативным и встречаться во многих серотипах, тем самым расширяя круг штаммов, против которых будет эффективна новая вакцина (62). Кроме того, использование гликотэгов позволяет регулировать степень гликозилированности белкового компонента и точно знать, по каким участкам проходит гликозилирование, что дает возможность на выходе получать более стандартизированный и однородный продукт (63-64). Вдобавок, гликотэги позволяют использовать в качестве носителей гораздо более широкий спектр белков, а это может помочь в борьбе с падением эффективности вакцин, вызванным индуцированной носителем эпитопной супрессией (65).

Помимо белков, различным модификациям подвергаются также и сами переносимые гликаны. Одна из существенных задач при использовании PGCT

- это полный перенос всех необходимых для катализа компонентов, прежде всего - генетического материала. В идеальном случае все необходимые для получения конечного продукта углеводы синтезируются в клетке-продуcente, в таком случае вмешательство в геном будет минимальным. Но так бывает не всегда. Наряду с установлением консенсусной акцепторной аминокислотной последовательности, которую способны распознавать ОСТ, исследователями были установлены консенсусные генные последовательности, отвечающие за оптимальный синтез ферментов, задействованных на каждом этапе биосинтеза гликанов. Это привело к созданию синтетических оперонов, которые позволяют применять PGCT даже к тем организмам, в которых единый генетический кластер синтеза гликанов отсутствует (66). Функциональный перенос в геном продуцента всех необходимых для углеводного биосинтеза компонентов получил название технологии экспрессии гликанов (Glycan Expression Technology, GET) (67-68). Как правило, locus биосинтеза гликанов клонируют и переносят целиком из нативного организма в подходящий штамм *E. coli*. Однако экспрессия генов в рамках этих путей была оптимизирована естественным отбором и вряд ли будет оптимальной для гетерологичного продуцента в неродственном организме. Частично проблемы, связанные с гетерологичной экспрессией мультигенных систем, могут быть решены путем деконструкции этих путей и перестройки их «снизу вверх». Использование методов сборки ДНК позволяет собирать их путем объединения определенных частей с необходимыми кодирующими последовательностями за один шаг. Значительно помогают в этом разработки в области молекулярного клонирования, такие, как метод сборки Гибсона (69), сборка Golden gate (70) или лигазная цепная реакция (71). В работе от 2022 г. авторы описывают применение подобного рефакторинга, то есть разборку сложных кластеров генов и перестройку их снизу вверх в модульном формате (72). Подобная конструкция с использованием четко определенных частей (синтетических промоторов, сайтов связывания рибосом, кодирующих последовательностей и терминаторов) стала возможной благодаря новым методам сборки ДНК,

которые объединяют несколько частей ДНК за один этап (73-75). Модульная и иерархическая природа этих сборок избавляет от необходимости клонировать большие генетические локусы целиком, облегчает идентификацию любых компонентов и обеспечивает платформу для эффективной оптимизации экспрессии с помощью итеративных циклов. В итоге авторы реорганизовали кластер *C.jejuni* *pgl* и перестроили его снизу вверх, используя комбинаторную сборку Start-Stop, модульную систему сборки ДНК без стыков, которая хорошо подходит для создания комбинаторных библиотек мультигенных экспрессионных конструкций (76). Несмотря на то, что в работу была взята лишь малая часть библиотеки, были выявлены клоны *pgl*, у которых выработка гликанов была выше, чем у нативного, немодифицированного кластера *pgl*, клонированного непосредственно из *C.jejuni*. Кроме того, улучшенная выработка гликанов привела к увеличению выхода гликоконъюгата в целом.

Помимо манипуляций с генами, вовлеченными в биосинтез требуемых гликанов, различные модификации могут проводиться и с другими участками генома хозяина. Так, внедрение в *E.coli* гена *gne*, кодирующего фермент, осуществляющий эпимеризацию N-ацетилглюкозамина (GlcNac) до N-ацетилгалактозамина GalNac, редуцирующего концевого сахара капсульного полисахарида *S.pneumonia* CPS4, значительно увеличивало выход гликоконъюгатов (62). Активация синтеза нуклеозидных сахаров может эффективно повысить выход O-полисахаридов и гликоконъюгата на их основе (77), а совместное использование глюкозы и глицерина как источников углерода для продуцентов, осуществляющих биосинтез гликопротеинов *de novo*, позволяет добиться значительного повышения выхода белок-полисахаридных конъюгатов (78)

Метаболизм клетки-продуцента при PGCT в целом подвергается значительным изменениям. Как правило, при работе с PGCT используются штаммы *E.coli* K12, лишенные O-антигенов. В число модификаций, проведенных в этих штаммах, входит удаление гена *waal*, кодирующего O-

антиген лигазу WaaL. Этот фермент содержится в периплазме и конкурирует с рекомбинантной ОСТ за УДППФ-связанные сахара, что снижает выход гликозилируемых белков (79). Также для повышения продуктивности рекомбинантных гликанов проводят удаление гена *wesA*, кодирующего фермент *WesA*, который катализирует перенос GlcNac на липидный носитель ундекапренилмонофосфат (УДППФ) на первом шаге биосинтеза нативных гликанов продуцента, таких, например, как общий энтеробактериальный антиген ЕСА и некоторые О-антигены *E.coli* (80). Истощение гена липопротеина Брауна приводит к появлению так называемых «пропускающих» (англ. «leaky») штаммов *E.coli*, которые способны высвобождать гликопротеины в наружную среду, тем самым облегчая процесс очистки готового продукта (81-82).

Развивая и совершенствуя технологии рекомбинантного гликозилирования, ученые создают новые, более эффективные методы, причем приоритетным является внедрение генетической информации обо всех компонентах непосредственно в хромосому, особенно когда речь идет о массовом биотехнологическом производстве (83). Одним из таких нововведений является модульная система для быстрой разработки конъюгированных вакцин-кандидатов (84). Эта платформа может быть адаптирована не только для *E. coli*, но и для других грамотрицательных бактерий, обеспечивая интеграцию и стабильную экспрессию гликоинженерного генного комплекса. Авторы называют этот метод гликоконъюгацией с использованием мобильных элементов путем встраивания в хромосому (англ. Mobile-element Assisted Glycoconjugation by Insertion on Chromosome, сокр. MAGIC) и утверждают, что он может быть совместим с уже известными методами РГСТ. Суть метода заключается в использовании мобильных генетических элементов (МГЭ), в частности, транспозона *tn5*, для интеграции сконструированных генетических последовательностей в хромосому *E.coli*. При обычной стратегии генные последовательности, кодирующие ОСТ, белок-акцептор и переносимый на

него полисахарид, встраивались в плазмиды, как правило, по одному конструкту в вектор, что плохо сказывалось на бактериальном метаболизме. Во-первых, такое серьезное вмешательство является довольно-таки стрессирующим для кишечной палочки из-за активации альтернативных путей биосинтеза полисахаридов (85). К тому же процесс такой серьезной перенастройки метаболизма продуцента требует исчерпывающей информации о генетической последовательности, кодирующей выбранный полисахарид, его структуре и синтезе. Во-вторых, использование трех независимых репликонов накладывает ограничения из-за возможной несовместимости точек *ori* и маркеров антибиотикорезистентности. Это может привести к потере плазмид и снижению выхода гликоконъюгата (86-88). В-третьих, накопились данные о том, что экспрессия PglB оказывает пагубное влияние на рост бактерий, снижая, таким образом, способность клеток продуцировать гликоконъюгаты (89-90). В совокупности это приводит к снижению биомассы и как следствие - низкой продукции вакцины. Разработчики MAGIC утверждают, что интеграция ОСТ в хромосомный геном *E. coli* в значительной степени облегчает метаболическую нагрузку и способствует прямому увеличению биомассы и выхода гликоконъюгата. Чтобы добиться такого результата, они предлагают использовать транспозон *tn5*, в нуклеотидную последовательность которого вставляют участки, кодирующие PglB и нативный белок-носитель *S.jejuni* AcrA, белки, обеспечивающие резистентность к антибиотикам (предпочтительнее к зооцину), а также ферменты, участвующие в биосинтезе требуемых полисахаридов (91). Модифицированные Tn5 помещают в векторные плазмиды и трансформируют ими клетки *E. coli*, после чего отбирают те, в которых произошла хромосомная вставка. Убедившись, что клетки несут нужную генетическую информацию, их трансформируют вектором, содержащим фермент рекомбиназу, которая удаляет вставки генов резистентности из бактериальной хромосомы (84).

Некоторые исследователи работают над созданием аттенуированных штаммов-продуцентов гликоконъюгированных вакцин *in vivo*, в которых

конечный продукт остается внутри клетки и вместе с ней попадает в организм при вакцинации (92). Другие создают внеклеточную систему гликозилирования, реализуя метод «один котел», при котором ОСТ, липид-связанные сахара и фракции белков-носителей смешиваются и взаимодействуют друг другом в отсутствие клеток (93-94). Генетически модифицированные штаммы *E. coli* могут продуцировать мембранные везикулы, декорированные гликопротеинами (англ. glycoOMV) или липид-связанными белками (95), а также модифицированные производные мембран, называемые универсальными модулями для мембранных антигенов (англ. generalized modules for membrane antigens, GMMA) (96), которые также предполагается использовать в производстве вакцин.

В качестве хозяев-продуцентов могут использоваться и другие виды бактерий, например, *Salmonella enterica* sv. *Paratyphi* A (97) и *Yersinia enterocolitica* O9, которая была применена для производства вакцин против *Brucella abortus* и *Brucella suis* (98-99). Ведутся работы по модификации отдельных штаммов *K. pneumoniae* (100).

Разработка технологий PGCT с самого начала шла в тесном взаимодействии с конструированием и совершенствованием ПКВ. Неудивительно, что первые попытки создать новую гликовакцину с применением методов PGCT начались практически параллельно с разработкой этих методов. Первое сообщение о создании прототипа вакцины на базе PGCT было опубликовано в 2010 г, исследователи присоединили O-антиген *S. dysenteriae* тип 1 к экзотоксину А из *P. aeruginosa* (EPA), несущему рекомбинантную вставку двух акцепторных последовательностей из PglB (86). В дальнейшем идея была подхвачена и развита в отношении самых разных микроорганизмов.

Один из самых распространенных и вредоносных возбудителей бактериальных пневмоний, менингитов и сепсиса - *Streptococcus pneumoniae*, пневмококк. Несмотря на наличие вакцин для профилактики вызванных им

заболеваний, *S. pneumoniae* по-прежнему является причиной более 1 миллиона смертей в год, главным образом среди детей в возрасте до пяти лет из развивающихся стран. В настоящее время обнаружено уже сто серотипов пневмококка (101). При этом даже разрабатываемая вакцина с наиболее широким спектром действия (PPV23) включает в себя только 23 серотипа (102-103). Производство такой сложной вакцины с помощью традиционного химического конъюгирования представляет собой очень дорогой процесс. Чтобы упростить и удешевить производство вакцин против *S. pneumoniae*, была применена технология PGCT, впрочем, не вполне удачно поначалу. Дело в том, что большая часть капсульных полисахаридов *S. pneumoniae* содержат в качестве концевого остатка нередуцирующий сахар, который не переносится с помощью CjPglB. Поэтому первые попытки создать вакцину против пневмококка были сосредоточены на серотипе 4, где концевым остатком был распознаваемый CjPglB GalNac. Акцептором был выбран нативный белок *S. jejuni* AcrA, в качестве ОСТ использовали CjPglB, клонированный в хромосому *E. coli* W3110, и полученный препарат защищал мышей при последующем инфицировании *S. pneumoniae* серотип 4 (104). Следующая попытка относилась к концепции вакцины «двойного действия» и была сопряжена с использованием консервативных белков *S. pneumoniae* в качестве носителей капсульных полисахаридных антигенов. Предполагалось, что это позволит создать гетерологичную защиту от неохваченных вакцинами серотипов и повысить иммунную защиту слизистых, стимулируя активацию Th17. Предварительно авторы показали, что с помощью PGCT можно получать рекомбинантные капсульные полисахариды *S. pneumoniae*, характерные для четырех наиболее часто вызывающих заболевания серотипов (68), но могут ли эти соединения обеспечивать такой же уровень защиты, как и классические ПКВ, не изучалось. Кроме того, оставался открытым вопрос об эффективности белковых антигенов *S. pneumoniae* как в качестве носителей капсульных полисахаридов, так и в роли собственно антигенов, напрямую стимулирующих защитный иммунитет. В связи с этим авторы протестировали

на мышинных моделях эффективность трехвалентного конъюгата, полученного с использованием PGCT. В состав конъюгата входили капсульный полисахарид ST4 и три белковых антигена *S. pneumoniae*: N-концевой фрагмент NanA, фактора вирулентности, который способствует росту и выживанию бактерии в носоглоточном тракте, (105-107), Th17-стимулирующий антиген Sp0148 (108) и ABC транспортер липопротеин PiuA (109-110). Ранее на мышинных моделях было показано, что эти белки способны вызывать синтез антител и являются перспективными антигенами (62). Полученные с помощью PglB *C. jejuni* в *E. coli* гликоконъюгаты при испытании на мышах индуцировали уровни антикапсулярных антител, аналогичные существующим вакцинам, а также вызывали сильные ответы на белковые антигены, которые распространялись и на другие, гетерологичные серотипы. Авторы отметили также, что экспрессия нескольких серотипов капсульных полисахаридов в *E. coli* открывает новые возможности для создания glyOMV в качестве альтернативного способа конструирования вакцины. Совместное использование GET и PGCT, возможно, позволит в дальнейшем разработать эффективную и недорогостоящую гликоконъюгированную вакцину против *S. pneumoniae* (62).

Еще один прототип, на этот раз поливалентный, был создан с использованием в качестве основной ОСТ фермента PglS из *A. baylyi*, способного переносить нередуцирующий глюкозный концевой остаток. В качестве белкового акцептора выступал естественный субстрат PglS, пилиноподобный белок ComP, который в *E. coli* гликозилировался капсульными полисахаридами *S. pneumoniae* CPS8, CPS9V и CPS14. Полученный препарат показал в предварительных тестах высокую иммуногенность, сравнимую с таковой у Превнар13. Кроме того, сыворотки мышей, привитых полученным препаратом, проявляли бактерицидную активность против *S. pneumoniae* серотипов 14 и 8 (SBA). Опираясь на полученные результаты, авторы сконструировали биоконъюгат на базе хорошо зарекомендовавшего себя белкового носителя ERA, модифицировав

его С-конец путем присоединения к нему акцепторной последовательности из 23 аминокислот Ala489–Arg490 белка ComP, и пневмококкового полисахарида CPS8. Полученный биоконъюгат вызывал у мышей активное образование антител класса IgG и обладал протективным действием, судя по результатам сывороточного бактерицидного анализа, причем для оказания защитного действия достаточно было всего 10 нг препарата (54). В 2022 г были озвучены новые результаты этой работы, биоконъюгат, получивший название CPS8-EPA<sup>iGTcc</sup>, был получен методом периодического культивирования с подпиткой в биореакторе и всесторонне оценен как в контексте его физических свойств, так и функциональной активности. Результаты свидетельствуют, что биоконъюгат, содержащий только один сайт гликозилирования, обладает высокой иммуногенностью, вызывает у мышей образование специфических для серотипа CPS8 антител класса IgM и IgG и обеспечивает защиту от инфекции и колонизации *S. pneumoniae* серотипа 8 (111). Однако до стадии клинических испытаний в настоящий момент ни один из перечисленных прототипов не дошел.

Разрабатываются также биоконъюгированные вакцины против других представителей стрептококков. Так, стрептококк группы В (СГВ, *Streptococcus agalactiae*, β-гемолитический стрептококк В) - это грамположительная условно-патогенная бактерия, которые чаще всего колонизирует нижние отделы желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Порядка 10-35% женщин заражены СГВ, что может приводить к различным острым заболеваниям у беременных или рожениц, а также к мертворождению, если инфекция достигает плода (112). СГВ также может передаваться новорожденному, где он обычно проявляется в виде Б-стрептококковой болезни (БСБ) раннего (первая неделя жизни) или позднего (первые 7-90 дней жизни) начала заболевания и может вызвать менингит, сепсис и пневмонию. По оценкам исследователей, ежегодно регистрируется более 200 000 и более 100 000 случаев раннего начала БСБ и позднего, соответственно (113-115). В США СГВ является наиболее распространенной

причиной младенческой заболеваемости и смертности, причем уровень смертности среди заболевших составляет 7%. В Африке, где лечение антибиотиками менее доступно, уровень смертности может достигать 19% (116). В России в ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ» был проведен ретроспективный анализ распространенности СГВ среди новорожденных пяти родильных домов города Москвы. По результатам микробиологического исследования 4534 проб клинического материала от 2265 новорожденных групп высокого инфекционного риска развития СГВ в среднем выделен у 4,9% (117). Более того, недавние исследования показали, что СГВ также является причиной значительного числа заболеваний у взрослых людей обоего пола в возрасте старше 18 лет и особенно у тех, кому за 65 (118). Все это делает разработку вакцины против СГВ крайне необходимой, особенно учитывая, что антитела против СГВ класса IgG могут передаваться плацентарно (119), а следовательно, вакцинация беременных может позволить снизить заболеваемость среди новорожденных. Вакцины против СГВ находятся на разных стадиях разработки уже более 30 лет, и недавно были проведены клинические испытания двух препаратов: рекомбинантной белковой серотип-независимой вакцины (120-121) и конъюгированной поливалентной вакцины на основе капсульного полисахарида СГВ (122). Однако классические методы изготовления вакцин часто обладают серьезными недостатками, чаще всего - высокой стоимостью и сложностью производства. В связи с этим была сконструирована полисахаридная вакцина на базе PGCT. Характеристику трехвалентной биоконъюгированной вакцины, нацеленной на три наиболее распространенных в клинике серотипа СГВ: тип Ia, тип Ib и тип III, опубликовали в работе от 2021 г. (123). Авторы показали, что модифицированный штамм *E. coli*, экспрессирующий капсульные полисахариды СГВ, способен правильно собирать полисахариды типа Ia, типа Ib или типа III. Затем они внедрили в *E. coli* локусы, необходимые для экспрессии белка PglS из *A. baylyi*, что позволило провести гликозилирование сконструированного белка-носителя на базе EPA и белка ComP сиаловыми

остатками согласно серотипам СГВ Ia, Ib и III. Дальнейшая иммунизация мышей полученным и очищенным препаратом показала, что трехвалентная биоконъюгированная вакцина против СГВ вызывает продукцию специфических для задействованных серотипов антител класса IgG, которые обладают нейтрализующей способностью (123). Однако эффективность антител против разных серотипов, использованных при создании вакцины, была неравномерной, и авторы предположили, что подобный эффект можно устранить путем дальнейших работ, направленных на изменение степени гликозилирования белка-носителя.

Технологии PGCT также могут быть применены и для создания вакцины от стрептококка группы А (*Streptococcus pyogenes* или стрептококк А). *S. pyogenes* является чрезвычайно распространенным патогеном, проявления которого варьируются от острого фарингита и импетиго до скарлатины и инвазивных заболеваний, таких как синдром токсического шока или некротизирующий фасцит. Подобные инфекции часто быстро прогрессируют, очень заразны, характеризуются высокой смертностью и заболеваемостью, а также нередко приводят к развитию вторичных заболеваний аутоиммунной природы, например, ревматических заболеваний сердца (РЗС), особенно в странах с низким и средним уровнем дохода (124). Необходимо отметить, что в последние годы отмечается подъем заболеваемости скарлатиной, а также растет число случаев сепсиса, связанного с инфекцией *S. pyogenes* (125-126), поэтому существует необходимость в разработке вакцины против стрептококка А. Дополнительным стимулом для создания подобных препаратов служит то, что поскольку человек является единственным естественным хозяином *S. pyogenes*, блокирование передачи этого патогена может привести к его полной элиминации. Стрептококк А, подобно *S. pneumoniae*, обладает высокой антигенной гетерогенностью из-за рекомбинационных процессов, распространенных среди обладающим различными профилями экспрессии факторов вирулентности у разных штаммов. Серотипы определяются различиями в главном факторе

вирулентности, белке М, они чрезвычайно многочисленны, не привязаны к географическим регионам и не коррелируют с проявлениями заболевания. Недавнее геномное исследование показало, что ни один белок, изученный при разработке вакцины, не был обнаружен в 100% проанализированных изолятов стрептококка А (127). Вследствие такой гетерогенности в поверхностных белках *S. pyogenes* исследователи сосредоточились на разработках ПКВ вакцин, тем более что ряд их уже был успешно разработан для другого представителя стрептококков, *S. pneumoniae*.

Полисахарид группы А (GAC, англ. Group A carbohydrate) очень консервативен и сохраняется на поверхностях всех штаммов стрептококка А (127-128). Представляет собой рамнозную линейную цепочку с чередующимися боковыми последовательностями GlcNAc, с повторяющимся трисахаридным звеном  $[(1\rightarrow3)\alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow2)[\beta\text{-DGlc}p\text{NAc}(1\rightarrow3)]\alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow3)]_n$  (129-130). GAC выполняет барьерную функцию, поддерживает морфологию клеток и обеспечивает клеточное деление (131). Кроме того, GAC также является основным фактором, определяющим вирулентность, обеспечивая устойчивость к воздействию нейтрофилов (128,132,129). Иммунологические исследования показали, что GAC доступен для связывания с антителами (129,133), при этом аффинно-очищенные антитела против GAC проявляют опсонизирующие свойства, особенно в отношении серотипов М3, М6, М14 и М28 (134). Это позволяет использовать GAC при создании ПКВ вакцины.

Особенности подбора белкового компонента для конъюгирования прояснили недавние исследования Di Benedetto et al. Они выявили, что для большей эффективности будущей вакцины необходимо сохранять белковые эпитопы носителей, так как случайное конъюгирование не влияло на синтез IgG к GAC компоненту, но значительно снижало анти-белковый ответ (135). В результате случайной конъюгации GAC с тремя белками *S. pyogenes* - SLO, SpyAD и SpySEP - несмотря на высокие титры анти-GAC IgG синтез антител к белковым компонентам был нарушен, что выразилось, в частности, в

сохранении способности SpyСЕР расщеплять IL-8. По-видимому, для создания эффективной вакцины «двойного действия» на базе собственных белков *S. pyogenes* и его же полисахарида GAC потребуется обеспечить чрезвычайно высокую точность при выборе участка присоединения полисахарида к белкам, что вполне может быть обеспечено при использовании PGST и технологии гликотэггов.

Тем не менее пока материалов о подобных попытках не опубликовано, хотя идеи уже обсуждаются (136).

Грам-отрицательная бактерия *Klebsiella pneumoniae* является вторым по распространенности условно-патогенным микроорганизмом после *E.coli* и считается основной причиной неонатального сепсиса, инфекций мочеполовых путей и внутрибольничных пневмоний. Из-за повышенной устойчивости к антибиотикам инфекции, вызванные данным патогеном, становится все труднее лечить. Бактерии приобретают такие механизмы устойчивости, как  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра действия и карбапенемазы *K. pneumoniae* (ESBL и KPC соответственно). ВОЗ присвоила самые высокие уровни опасности изолятам ESBL и KPC (137). Таким образом, существует острая необходимость в профилактической и эффективной иммунотерапии. К сожалению, в настоящее время лицензированной вакцины против *K. pneumoniae* не существует.

Различные группы исследователей одновременно работают над несколькими прототипами вакцин. Так, Feldman et al. (2019) сосредоточились на создании вакцины против *K. pneumoniae* гипервирулентного типа (hvKp), поскольку именно эта разновидность патогена является наиболее опасной. Если другие серотипы, как правило, вызывают заболевания у иммунокомпрометированных лиц, таких, как пациенты стационаров, пожилые люди, младенцы или люди с иммунодефицитами различной природы, то hvKp представляют угрозу и для абсолютно здоровых людей, при этом летальная доза при заражении крайне мала и составляет для мышей всего 50 бактерий на 1 животное (55). Механизмы гипервирулентности до конца не выяснены, но

предполагается, что основной причиной является избыточное производство капсульного полисахарида, что значительно затрудняет выведение вируса из организма и тем самым приводит к повышенной патогенности штаммов hνКр. Хотя по набору капсульных полисахаридов выделяется более 80 серотипов *K. pneumoniae*, подавляющее большинство гипервирулентных инфекций вызывают серотипы K1 и K2. Именно против этих двух серотипов и разрабатывается вакцина. В качестве основной ОСТ исследователи выбрали PglS из *A. baylyi*, в качестве белка-носителя - ERA из *P. aeruginosa*, слитый с белком ComP. В качестве углеводного компонента были использованы капсульные полисахариды K1 и K2, кластеры синтеза которых клонировали в клетки-продуценты *E. coli*, в которых были частично заблокированы естественные гликозилтрансферазы для повышения гетерологичной экспрессии рекомбинантных полисахаридов. Полученные гликопротеины при введении их мышам показали способность к индукции синтеза антител класса IgG1, а также протективные способности, значительно повышая выживаемость мышей при последующем заражении животных.

Другая группа исследователей конструирует вакцину против классических серотипов *K. pneumoniae*, сКр, в качестве углеводного компонента выбрав O-антигены бактериального липополисахарида. Это связано с тем, что в отличие от капсульных полисахаридов, в настоящий момент известно всего 11 серотипов O-антигенов, экспрессируемых *K. pneumoniae*, и на четыре из них (O1, O2, O3 и O5) приходится более 80% клинических изолятов во всем мире (138). На их основе была сконструирована гептавалентная биоконъюгатная вакцина, включающая в себя O1v1 (O1), O1v2 (O1afg), O2v1 (O2a), O2v2 (O2afg), O3, O3b, и O5 субтипы O-антигена. Поскольку O-антигены O3 и O5 *K. pneumoniae* оказались структурно идентичны O-антигенам O9 и O8 *E. coli*, в рабочий штамм были клонированы именно последние, то есть колийные кластеры синтеза O-полисахаридов O8 и O9. В качестве ОСТ был выбран фермент PglS, белок-носитель - рекомбинантный ERA, несущий вставку из 23 аминокислот, составляющих

нативную акцепторную последовательность для PglS. В качестве продуцента для гликопротеинов с O-антигенами O1v1, O2v1, O2v2, O3, O3b, and O5 использовали штамм *E. coli* CLM24. Биоконъюгат O1v2 был получен непосредственно из генетически модифицированного штамма *K. pneumoniae* NTUH-K2044, который исходно продуцирует O-антигенный полисахарид O1v2. Для улучшения выхода биоконъюгата O1v2 из хромосомы NTUH-K2044 были удалены гены *wcaJ* и *waaL*. Делеция *wcaJ* предотвращает синтез капсулы K1, которая в противном случае могла бы попасть в белок-носитель и загрязнить биоконъюгат O1v2. Полученный таким образом штамм был трансформирован плазмидой, кодирующей белок-носитель и PglS. После выделения и очистки гликопротеины всех 7 типов были использованы для иммунизации мышей, что сопровождалось выработкой высокого уровня антител класса IgG. Однако при совместном культивировании мышинных постиммунизационных сывороток, кроличьего комплемента и клинических изолятов, содержащих различные штаммы *K. pneumoniae*, было выявлено примерно 30% штаммов, в которых не наблюдалось гибели бактерий, тогда как в остальных случаях сыворотки проявляли среднюю либо высокую бактерицидность. Авторы связывают это обстоятельство с тем, что в некоторых серотипах *K. pneumoniae* капсульные полисахариды способны скрывать O-антигены, не давая им связываться с антителами (139). На основании этих данных авторы предполагают, что для наилучшего эффекта вакцины против *K. pneumoniae* должны содержать как O-антигены липополисахарида, так и капсульные антигены.

Еще одна вакцина против *K. pneumoniae* с использованием одновременно нанотехнологий и PGCT разрабатывается на базе O-связанной гликозилтрансферазы PglL. В качестве белка-акцептора для PglL был использован универсальный рекомбинантный белок SpyCather4573, и в рамках этого исследования был разработан гликомодифицированный штамм *E. coli*, в геном которого интегрированы оба ключевых компонента (SC4573 и PglL). Гликопротеины, полученные таким образом, могут спонтанно

связываться с белковыми наноносителями *in vitro* с помощью SpyTag с образованием конъюгированных нановакцин. Для повышения эффективности экспрессии гликопротеинов была удален кластер генов *yfdGHI*. Полученная конъюгированная нановакцина против *Klebsiella pneumoniae* O1 (KPO1-VLP) продемонстрировала свою эффективность в экспериментах, где после трехкратной иммунизации наблюдались титры антител от 4 до 5 (Log10) и 100% защита от заражения вирулентным штаммом (140).

Еще один возбудитель, против которого на настоящий момент не имеется готовой лицензированной вакцины, - микробы рода *Shigella*. Эти грамотрицательные бактерии, принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae*, проникают в желудочно-кишечный тракт, инфицируют слизистую оболочку толстой кишки и вызывают воспаление (141). Клиническая картина представляет собой прежде всего нарушения стула и проявляется либо в виде классической дизентерии, либо в виде водянистой диареи. Несмотря на то, что шигеллез может передаваться только от человека к человеку, он, к сожалению, очень распространен, так как передается фекально-оральным путем, с зараженной пищей и водой, и обладает высокой вирулентностью - так, по оценкам, для возникновения заболевания достаточно от 10 до 100 бактерий (142). Шигеллез является основной причиной смерти от диареи во всем мире. Больше всего страдают дети в возрасте до 5 лет в странах с низким и средним уровнем дохода, особенно на втором году жизни (143-144). По оценкам ученых из группы исследования глобального бремени болезней (ГББ), за 2019 год от шигеллеза умерло 148 000 человек, 93 000 из которых - дети в возрасте до пяти лет (145). Шигеллез также является угрозой для путешественников и военнослужащих, дислоцированных в эндемичных районах (146). Кроме того, шигеллез рассматривается в качестве основной причины замедления роста среди детей младшего возраста в странах с низким уровнем дохода (147-148). В настоящий момент известно четыре вида шигелл - *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* и *Shigella boydii*, и три из них представлены множественными серотипами, что значительно усложняет разработку вакцин.

Наибольшую угрозу здравоохранению представляет вид *S. flexneri*, особенно часто встречающийся в странах с низким уровнем дохода. Известно 15 серотипов *S. flexneri*, наиболее распространенным из которых является *S. flexneri 2a*, за которым следуют *S. flexneri 3a* и *S. flexneri 6*. Для *S. sonnei* известен один серотип, это доминирующий вид шигелл в промышленно развитых странах. Для *S. dysenteriae* описано 15 серотипов, наиболее распространенным из которых является *S. dysenteriae 1*, в свое время бывший причиной эпидемических вспышек с высоким уровнем смертности. *S. boydii*, характеризующийся наличием 19 серотипов, реже становится причиной заболеваний и в основном выявляется в Южной Азии (149). В соответствии с текущими рекомендациями ВОЗ антибиотики следует назначать только при наличии симптомов дизентерии. Однако шигеллез далеко не всегда сопровождается симптомами классической дизентерии, и тогда для постановки диагноза требуются лабораторные анализы, которые зачастую невозможны в условиях местных медицинских учреждений (150-151). Кроме того, рост числа устойчивых к антибиотикам микроорганизмов снижает эффективность лечения (152-153). Все эти факторы делают разработку вакцины против шигелл неотложной задачей общественного здравоохранения во всем мире. Разработчиками вакцин было применено несколько подходов. В широком смысле они делятся на пероральные цельноклеточные вакцины, состоящие в основном из живых ослабленных или инактивированных вакцин, и парентеральное введение рекомбинантных препаратов, в основном гликоконъюгатов, разработанных на базе ключевых антигенов шигелл. Так, в 1960-х годах живая ослабленная вакцина, разработанная Дэвидом Мелом, показала свою эффективность как среди призывников (154), так и среди детей в возрасте 2-8 лет (155) в бывшей Югославии. Позднее Cohen et al. разработали гликоконъюгированную вакцину против *S. sonnei* на базе О-антигена, которая показала свою эффективность при вакцинации новобранцев израильской армии (156). В последующем исследовании, проведенном среди израильских детей, было показано, что препарат эффективен и для детей в возрасте от трех

лет (157). В Российской Федерации ООО «Гритвак» разработана и в 2002 г. зарегистрирована полисахаридная дизентерийная вакцина против шигелл Зонне, торговое наименование Шигеллвак (Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне полисахаридная). Препарат представляет собой высокоочищенный полисахарид, извлеченный из культуры *S. sonnei* (158). Успешно прошел III фазу КИ отечественный вакцинный препарат для профилактики дизентерии Флекснера ФЛЕКСВАК (ООО «Гритвак», Российская Федерация), представляющий собой водный раствор модифицированных липополисахаридов, извлеченных из вирулентной культуры *S. flexneri*. Модификация липополисахаридов заключается в химической детоксикации, позволившей резко снизить токсичность и пирогенность, но не затронувшей O-специфический полисахарид, отвечающий за антигенные свойства (159). В ходе исследований, проведенных на группе добровольцев от 18 до 60 лет, при однократном введении вакцины в дозировке 125 мкг/0,5 мл препарат показал безопасность, высокую иммуногенность и низкую реактогенность (160).

Тем не менее, несмотря на более чем 100-летнюю историю разработки и большое количество клинических испытаний (161), лицензированной международной вакцины против шигеллеза пока не существует.

Среди других подходов для создания такой вакцины используются и технологии PGCT. Так, прототипы вакцин от Limmatech Biologics AG на базе биоконъюгации, как и классические ПКВ, в основе своей содержат углеводные антигены, экспонированные на поверхности патогена. В случае шигелл этим компонентом, как правило, становится O-антиген липополисахарида. Это связано с тем, что большая часть шигелл как грам-отрицательных микробов не обладает капсулой (исключение составляет *S. sonnei*, но капсула этого микроба состоит из того же самого O-антигена (162,141)). В связи с этим специфическая защита при шигеллезе включает в себя иммунный ответ на O-антиген. Однако O-антигены шигелл являются серотип-специфичными, и это создает дополнительные трудности при создании вакцин. Исследования на приматах

(163), исследования на модели контролируемой инфекции человека (СНИМ) (164) и эпидемиологические исследования естественного заражения шигеллами (165) убедительно доказывают, что эффективность защиты от шигеллеза в значительной степени зависит от серотипа патогена. Исследователи наблюдали примерно 70%-ную защиту от последующей гомотипической инфекции, но не от гетеротипической (161). Серотипирование изолятов шигелл, полученное в ходе Глобального исследования по борьбе с кишечной инфекцией (GEMS) (143), свидетельствует, что вакцина, состоящая из 2а, 3а и 6-антигенов *S. flexneri*, а также О-антигенов *S. sonnei*, может обеспечить прямую защиту от 64% изолятов шигелл во всем мире (166). Охват может увеличиться и до 88% благодаря перекрестной защите от серотипов *S. flexneri*, примеры которой наблюдалась у морских свинок (167). Таким образом, набор гликанов, которые исследователи используют при создании новых гликоконъюгированных вакцин, как правило, включает в себя эти соединения. В качестве белкового компонента преимущественным образом применяют модифицированный экзотоксин А *P. aeruginosa* (rЕРА) (2).

Первой биоконъюгированной вакциной, протестированной на людях, был препарат, изготовленный против *S. dysenteriae* (168). При его создании полисахарид О-антигена *S. dysenteriae* типа О1 был биоконъюгирован в *E. coli* с рекомбинантной версией ЕРА и кластером PglB, после чего получил название GVXN SD133 и прошел фазу 1 на здоровых добровольцах в Швейцарии (169) с целью изучения безопасности и иммуногенности. Вакцину вводили дважды, на 0-й и 60-й день, отдельно или в комбинации с адьювантом (гидроксидом алюминия). Результаты показали, что вне зависимости от способа введения препарат хорошо переносился и продемонстрировал приемлемый уровень безопасности, сопоставимый с тем, что отмечался для уже созданных вакцин. Исследование крови участников выявило статистически значимое стабильное повышение уровня антител к О1, как IgG, так и IgA, во всех группах, независимо от состава и дозы вакцины (168).

Нейтрализующая способность антител к белковому носителю ЕРА также была продемонстрирована с помощью анализа *in vitro* (169).

Затем была создана и клинически оценена другая моновалентная вакцина против шигелл, на основе О-антигена *S. flexneri* 2a, также на базе ОСТ *C. jejuni* PglB. В качестве белкового носителя был выбран тот же rЕРА. Исследование начальной фазы I (170) проводилось в NMRC (Военно-морской медицинский исследовательский центр), с участием добровольцев, которые с интервалом в один месяц получили две инъекции 10 г полисахарида биоконъюгата *S. flexneri* 2a (получившего название Flexyn2a), отдельно или в комбинации с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта. Были подтверждены безопасность и иммуногенность этого второго прототипа биоконъюгированной вакцины, и аналогично результатам, полученным в ходе исследования с вакциной против *S. dysenteriae*, иммунизация препаратом Flexyn2a выявила значительное повышение титров IgG и IgA против ЛПС *S. flexneri* 2a (2). Сравнение групп также не выявило существенных различий между получавшими адъювантную терапию и не получавшими таковой, что свидетельствует о высокой иммуногенности препарата. Активность антител, индуцированных вакциной, была подтверждена с помощью анализа сыворотки на бактерицидность (SBA). Кроме того, после вакцинации удалось выявить плазматические клетки, секретирующие специфические антитела к *S. flexneri* 2a (IgA и IgG). Опираясь на полученные результаты, прототип Flexyn 2a был протестирован методом контролируемого инфицирования человека (CHIM) для оценки эффективности вакцины. Рандомизированное двойное слепое и плацебо-контролируемое исследование фазы 2b (171) было проведено в Блумбергской школе общественного здравоохранения имени Джона Хопкинса (2) и показало достаточный уровень безопасности вакцины, что же касается иммуногенности, то после первой дозы уровень IgG увеличивался примерно в 10 раз по сравнению с исходным уровнем (172). В целом можно сказать, что вакцина вызвала надежный и функциональный системный иммунный ответ, в том числе и на уровне слизистых оболочек. Как

описано в работе Talaat et al. (171), эффективность биоконъюгата Flexyn 2a была дополнительно подтверждена различными анализами, включая оценку степени тяжести протекания шигеллеза. Было показано, что у вакцинированных этот показатель был ниже, чем у пациентов, получавших плацебо, что еще раз доказывает, что даже если вакцинация не предотвращала заболевание полностью, то по крайней мере уменьшала его тяжесть. В целом исследование показало четкую связь между иммунными реакциями, вызванными вакцинацией, и защитой от шигеллеза после последующего перорального заражения. Кроме того, предварительные анализы, проведенные в рамках этого исследования, также показали активацию иммунитета слизистой оболочки после парентеральной иммунизации и связь между такими реакциями слизистой оболочки и защитой от заболеваний (173).

Многообещающие результаты, продемонстрированные Flexyn2a, способствовали разработке поливалентной биоконъюгированной вакцины, направленной на обеспечение широкой защиты от наиболее распространенных серотипов шигелл. S4V - это четырехвалентная биоконъюгированная вакцина, которая содержит O-антигены *S. flexneri* серотипов 2a, 3a, 6 и *S. sonnei*, биоконъюгированные с белком-носителем ЕРА. В настоящее время в Кении проводится двойное слепое исследование S4V по подбору дозы и возрастной категории (взрослые-дети-младенцы). Работа находится на этапе 1/2 - оценка безопасности и иммуногенности вакцины в целевой группе, состоящей из 9-месячных младенцев (174). Испытываются четыре различные дозы, с алюминиевым адъювантом или без него, а также схема вакцинации двумя дозами через 9 и 12 месяцев с последующей повторной вакцинацией через 6 месяцев. Данные, собранные в ходе этого исследования, станут важным шагом в разработке вакцины против шигелл. Также это поможет расширить научные знания об иммунных реакциях на O-антигены *Shigella* у детей. Авторы рассчитывали получить и опубликовать результаты в течение 2023 года (2). Однако в настоящий момент этого не произошло (175).

Золотистый стафилококк (*S. aureus*) является причиной многочисленных заболеваний человека, включая эндокардит, пневмонию и раневые инфекции. Метициллинрезистентный золотистый стафилококк (так называемые штаммы MRSA) к сожалению, является частым гостем в учреждениях здравоохранения и распространяется по всему миру, создавая серьезную глобальную проблему (176). В связи с этим существует острая необходимость в вакцине для профилактики стафилококковых заболеваний. К настоящему моменту в ходе клинических испытаний было протестировано несколько вакцин, но они оказались малоэффективными (177). Еще один вариант вакцины был создан с использованием технологий PGCT. В работе Wacker et al. описываются результаты тестирования на мышах трех конъюгатов: CP5-EPA, CP8-EPA и CP5-H1a, где CP5 и CP8 - капсульные полисахариды *S. aureus* серотипов соответственно 5 и 8, EPA - экзотоксин A *P. aeruginosa*, а H1a -  $\alpha$ -токсин *S. aureus*. В работе использовали PglB из *C. jejuni*. Биоконъюгаты были синтезированы в *E. coli*, выделены и очищены с помощью аффинной хроматографии, после чего введены мышам. Все три прототипа вызывали индукцию антител на высоком уровне, кроме того, при оценке защитной эффективности препаратов против бактериемии и летальной пневмонии наилучшие результаты показал конъюгат CP5-H1a. В то время как CP5-Epa и CP8-Epa значительно снижали бактериемию, биоконъюгированная вакцина CP5-H1a защищала как от бактерий, так и от пневмонии со смертельным исходом (66). Однако в настоящий момент нет сведений о каких-либо клинических испытаниях этих многообещающих прототипов (178).

Технология PGCT была применена для создания прототипов вакцин против *Francisella tularensis*, внутриклеточного патогена, вызывающего туляремию, потенциально смертельное заболевание (179). Для человека наиболее опасны два подвида: *F. tularensis tularensis* (тип А) и *F. tularensis holarctica* (тип В) (180). В то время как штаммы типа А вызывают более тяжелые и опасные для жизни заболевания, системная инфекция штаммами типа В является наиболее распространенной формой туляремии человека

(179). *F. tularensis* легко передается разнообразными путями, в том числе воздушно-капельным и воздушно-пылевым, и обладает высокой степенью инфекционности и летальности. На базе клинического изолята *F. tularensis* типа В был разработан аттенуированный живой вакцинный штамм для введения лицам, входящим в группу риска, но он так и не был лицензирован из-за ряда побочных эффектов (181-182). В качестве потенциальной мишени для использования в вакцине наиболее часто рассматривался О-антиген *F. tularensis* (183-185). Однако разработанные на основе О-антигена гликоконъюгатные вакцины защищали мышей только при внутрикожном введении патогена (183) и не обеспечивали защиту от интраназальных инфекций (185).

Одним из вариантов для создания эффективной защиты против *F. tularensis* стало создание биоконъюгированной вакцины. В работе от 2013 г. описываются результаты первой такой попытки. Авторы с помощью CjPglB получили в *E. coli* гликоконъюгат, состоящий из О-антигена *F. tularensis* и ЕРА, и испытали его на мышинной модели. Полученный рекомбинантный гликоконъюгат отличался высоким выходом, стимулировал выработку специфических антител и обеспечивал защиту от последующего заражения вирулентным диким штаммом *F. tularensis subsp. holarctica* (87). Развивая эту идею, авторы в дальнейшем провели модификацию носителя ЕРА, внося в него дополнительные 8 акцепторных последовательностей, чтобы увеличить степень его гликозилированности остатками О-антигена франсизеллы, поскольку в нативном состоянии последний представляет собой повторяющиеся тетрасахаридные структуры (186). Испытания полученного гликоконъюгата проводили на крысах линии F344 (64), параллельно сравнивая его действие с действием аттенуированной вакцины, разработанной ранее для людей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что новый гликоконъюгат действительно обладал большей степенью гликозилированности, что подтверждалось возросшей молекулярной массой, и эффективнее стимулировал образование специфических антител, защищая

крыс от развития заболевания при последующем инфицировании *F. tularensis*. Однако степень эффективности во многом зависела от способа иммунизации - наилучшая защита наблюдалась при подкожном введении. При этом контрольные опыты по введению крысам адьюванта MF59 неожиданно показали достаточно высокий процент выживаемости даже невакцинированных прототипом животных - порядка 3/5. Авторы предполагают, что это было вызвано способностью MF59 вызывать стойкую и длительную активацию врожденного иммунитета. Тем не менее исследователи планируют дальнейшие работы над представленным прототипом вакцины, намереваясь заменить белок-носитель ЕРА на нативные белковые антигены *F. tularensis*. Полученный препарат в таком случае будет являться вакциной «двойного действия», что уже дало эффект при разработке вакцины против *S. aureus* (66).

Еще одна попытка создать новую вакцину против *F. tularensis* была сопряжена с использованием уже упоминавшейся экспериментальной технологии MAGIC (84). В качестве ОСТ использовался PglB, белок-носитель - периплазматический Stea из *C. jejuni*, для удобства выделения оснащенный вставкой bHis, полисахарид - О-антиген *F. tularensis*, организм-продуцент - *E. coli*, все компоненты внедрялись в бактериальную хромосому. В целом эта работа была скорее демонстрацией применимости новой технологии, в связи с чем не проводились преклинические испытания на животных, ограничившись лишь исследованиями реакций полученного препарата с антителами в сыворотках крови методом ИФА, а полученные таким образом результаты сравнивались с аналогичными для гликоконъюгата, полученного более традиционным способом - посредством трансформирования клеток тремя плазмидами, содержащими те же генетические вставки. Оба полученных конъюгата после очистки реагировали с антителами против О-антигена *F. tularensis*, но продуктивность при использовании MAGIC была выше. Дальнейшие работы, по-видимому, позволят оценить точнее перспективы данного препарата.

Патогенные штаммы *E. coli* в зависимости от локализации заболевания делятся на две группы: внекишечная патогенная *E. coli* (ExPEC) и кишечная патогенная *E. coli* (InPEC). В то время как штаммы ExPEC в основном связаны с неонатальным менингитом (НМ) и инфекциями мочевыводящих путей у взрослых (ИМП), штаммы InPEC вызывают прежде всего различные диарейные заболевания и подразделяются на 6 патотипов: энтеропатогенная *E. coli* (EPEC), энтерогеморрагическая *E. coli* (EHEC), энтероинвазивная *E. coli* (EIEC), энтероагрегирующая *E. coli* (EAEC), диффузно агрегирующая *E. coli* (DAEC) и энтеротоксигенная *E. coli* (ETEC) (187). Эти патотипы различаются по факторам вирулентности, механизмам инфицирования, взаимодействию с энтероцитами, тканевой тропности, симптомам и синдромам вызываемых заболеваний (188-189). Штаммы группы EHEC представляют серьезную угрозу здравоохранению, так как являются причиной многочисленных вспышек заболеваний по всему миру. Одним из наиболее распространенных представителей этой группы является энтерогеморрагическая кишечная палочка O157:H7 (*E. coli* O157). Она вызывает диарею, геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром (ГУС) (190-191). Традиционная антибактериальная терапия, к сожалению, не всегда оказывает должный эффект, так как в результате опосредованного антибиотиками бактериолиза происходит высвобождение в слизистую кишечника токсина Шига, что только увеличивает частоту ГУС (192-193). Потребность в вакцинах для профилактики *E. coli* O157 очень высока. Работы в этом направлении ведутся уже довольно давно, ряд препаратов даже проходит преклинические и клинические испытания (194).

В их числе и биоконъюгатная вакцина против *E. coli* O157 (195). В качестве белка-носителя авторы выбрали мальтозосвязывающий белок (MBP). Недавние исследования показали, что MBP *E. coli* обладает свойствами агониста TLR4, который индуцирует активацию сигнального пути NF-κB и секрецию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α и IL-12p70 (196). Конъюгацию осуществляли, используя PglB, к белку

присоединяли О-антиген *E. coli* O157, основываясь на предыдущих данных о его иммунных свойствах (197-198), организмом-продуцентом выступал штамм *E. coli* W3110. Результаты свидетельствовали, что полученный конъюгат способствовал активации как гуморального, так и клеточного звена иммунитета, причем бактерицидная активность сыворотки крови иммунизированных О-Ag-MBP мышей превышала таковую у иммунизированных одним MBP в 16 раз (195). Последующие работы показали, что иммунологическая эффективность гликоконъюгатов на базе О-антигена *E. coli* O157 и MBP во многом определяется конфигурацией сайтов гликозилирования и их числом и может быть модифицирована путем генетических манипуляций с пептидами, формирующими их (199). Однако сведений о начале клинических испытаний вакцины-кандидата пока нет.

Еще один прототип биоконъюгированной вакцины был создан с использованием уже упоминавшейся экспериментальной технологии MAGIC (84). Биоконъюгат был получен в непатогенной бактерии *Citrobacter sedlakii* NRC6070, которая экспрессирует аналогичный *E. coli* O157 О-антиген. Белок-носитель, использованный для создания препарата, - CmeA 6xHis, полисахаридный компонент - О-антиген *C. sedlakii*, в качестве ОСТ использовался PglB. Прототип был получен, согласно утверждениям авторов, за неделю и по своим биохимическим показателям соответствовал заявленным требованиям. К сожалению, пока также нет данных о каких-либо клинических испытаниях полученного препарата.

Внекишечные штаммы патогенной *E. coli* ((ExPEC) также довольно опасны, так как способны вызывать различные заболевания (200), причем в зависимости от того, какие именно, штаммы ExPEC подразделяются на три основных патотипа: уропатогенная *E. coli* (UPEC), вызывающая сепсис *E. coli* (SEPEC), и *E. coli*, ассоциированная с неонатальным менингитом (НМ) (201). Среди всех инфекций, вызываемых внекишечными *E. coli*, чаще всего очагом локализации становятся мочевыводящие пути (202). На долю ExPEC приходится 80% всех случаев ИМП (203). К сожалению, ИМП, вызываемые

ExPEC, крайне тяжело поддаются излечению (204). Создание эффективных вакцин, предотвращающих подобное развитие событий, является крайне важной задачей.

Наряду с другими подходами, исследователи применили и методы PGCT для решения этой задачи. Так, близятся к завершению клинические испытания III стадии 9-валентной биоконъюгатной вакцины ExPEC9V. Работы начались с создания 4-валентного прототипа, в состав которого входили четыре наиболее распространенных в клинических изолятах при ИМП вариантов O-антигена, конъюгированных с носителем экзотоксина *A. P. aeruginosa*. Доклинические испытания показали устойчивый антигенспецифический ответ в виде антител класса IgG на животных моделях - кроликах, мышах и крысах (205). Безопасность для людей и иммуногенность препарата были оценены в ходе трех испытаний. Два испытания первой фазы продемонстрировали переносимость и достоверное повышение уровня IgG в сыворотке крови для всех антигенов. Вакцина также значительно снизила количество случаев ИМП, с которыми сталкивались участники (206- 207). На этапе II, проведенном Frenck et al. (208), сообщалось, что у 80% участников наблюдалось как минимум двукратное повышение уровня серотип-специфических IgG. Обновленный состав девятивалентной вакцины ExPEC9V, содержащий конъюгированный полисахарид, в настоящее время проходит клинические испытания III фазы (NCT04899336). Это исследование продолжает работу, проведенную недавно для изучения безопасности и иммуногенности среди пожилых людей в возрасте 60-85 лет, с использованием 10-валентного препарата ExPEC10V (I и II фазы). Как и четырехвалентный прототип, этот препарат хорошо переносился и индуцировал выработку антигенспецифических антител у большинства участников, несмотря на их преклонный возраст (209). Увеличение количества O-антигенов и тестирование эффективности против системной инфекции можно рассматривать как попытку преодолеть значительную антигенную гетерогенность ExPEC. Например, 4 O-серотипа, выбранные для ExPEC4V,

охватывают только 30-35% изолятов *E. coli* при цистите, хотя авторы ссылаются на неопубликованные данные, согласно которым 12 O-серогрупп являются основными факторами, вызывающими ИМП (210). Однако недавнее всестороннее исследование тысяч случаев бактериемии ExPEC по всему миру показало, что девять наиболее распространенных O-серотипов составляют 64,6% изолятов *E. coli* в крови (211). Если предположить, что O-антигены были выбраны на основе их распространенности в изолятах *E. coli*, то на эти девять серогрупп приходится 34-58% случаев цистита, вызванного *E. coli*, и от 47 до 66% случаев пиелонефрита, вызванного этим же патогеном (212-213). Таким образом, вакцинация, основанная на реакциях против O-антигенов, может не обеспечивать полной защиты даже от инвазивных заболеваний (214). Тем не менее, особенно учитывая отсутствие лицензированных вакцин против ExPEC, результаты данной работы выглядят многообещающими.

Схожий подход был применен при создании прототипа вакцины на базе O25B антигена ExPEC. Хотя O-антиген *E. coli* имеет самую разнообразную структуру, насчитывающую более 180 индивидуальных серотипов, которым приписываются уникальные структуры (215), исследование изолятов, полученных от носителей ИМП, показало, что значительное число их относится к серотипу O25B (216). Поэтому группой исследователей была предпринята попытка создать вакцину на базе именно этого антигена. Кластер O-антигена был встроен в геном *E. coli* W3110, после чего экспрессированный полисахарид был ферментативно конъюгирован с ЕРА *Pseudomonas aeruginosa* олигосахарилтрансферазой PglB. Детальная характеристика конъюгата O25B-ЕРА с использованием физико-химических методов, включая ЯМР и ГХ-МС, подтвердила структуру O25B, открывая тем самым возможность разработки поливалентной конъюгированной вакцины против ExPEC на базе O25B-ЕРА (217).

Использование фермента PglL дало положительные результаты в разработке вакцин против *S. enterica* sv. *Paratyphi*. В прошлом основным патогеном считался *S. Typhi*, однако в последние годы благодаря разработке

эффективной вакцины против брюшного тифа *S. Paratyphi A* постепенно стал основной причиной кишечной лихорадки. Паратифная лихорадка по симптомам неотличима от брюшного тифа, а развитие резистентности (например, к налидиксовой кислоте, хлорамфениколу, ампициллину и хинолонам) значительно затрудняет ее лечение (218-219). Однако лицензированной вакцины против *S. Paratyphi A* пока нет. Наиболее перспективными из разрабатываемых в настоящее время являются ослабленные пероральные и гликоконъюгированные вакцины (220). Одним из таких перспективных препаратов стал биоконъюгат, полученный с помощью PglL. Для получения белка-носителя из последовательности PilE, природного субстрата PglL (221-222) был выбран фрагмент (45SAVTEYYLNHGEWPGNNTSAGVATSSEIK73), где серин63 является сайтом гликозилирования, и присоединен к С-концу субъединицы холерного токсина В, в результате чего был получен гибридный белок, названный СТВ4573. В предыдущей работе авторами было показано, что конъюгированная вакцина может быть получена в предварительно ослабленной *S. Paratyphi A* (223), что позволяет избежать переноса кластера О-антигена в организм-продуцент и тем самым сильно упрощает процесс. В новом исследовании авторы заменили ген регулятора длины полисахаридной цепи cld на его аналог из *S. typhimurium*, в результате чего была получена более длинная полисахаридная цепь, которая и была использована для получения вакцины. Результаты продемонстрировали, что гликопротеин может вызывать специфические защитные иммунные реакции. Дополнительные модификации последовательности гликозилирования позволили добиться более выраженного иммунного ответа (97). Однако данных о начале клинических испытаний препарата пока нет.

Прототип вакцины был создан для защиты от *Burkholderia pseudomallei*. Эта грамотрицательная бактерия, эндемичная для Юго-Восточной Азии и Северной Австралии, является возбудителем мелиоидоза (224). Обладает высокой устойчивостью к агрессивным воздействиям окружающей среды и

классифицируется как потенциальное оружие биотерроризма класса В из-за высокой заразности при распылении (225). Было идентифицировано несколько факторов вирулентности, включая множественные системы секреции III и VI типов, токсины, капсульный полисахарид и липополисахаридный комплекс (226). В *B. pseudomallei* идентифицируются две различные структуры липополисахарида, названные О-полисахариды (OPS) I и II, причем было показано, что О-полисахарид II необходим для сывороточной резистентности и вирулентности (227-229). Этот полисахарид был выбран в качестве антигенной основы для биоконъюгатной вакцины. В результате проведенных исследований было установлено, что биосинтез OPS II *B. pseudomallei* может быть воссоздан в *E. coli*. Успешное получение конъюгата требовало экспрессии соответствующих генов *B. pseudomallei* в штамме *E. coli*, в котором отсутствовали как waaL-лигаза, так и wcaA-иницирующая гликозилтрансфераза. В качестве ОСТ использовали PglB, белка-носителя - AscA. Этот гликоконъюгат, введенный мышам, был способен вызывать направленный иммунный ответ в виде антител класса IgG против *B. pseudomallei* и обеспечивать частичную защиту от инфекции на мышинной модели мелиоидоза (230).

Технологии PGCT используются при создании вакцины против *B. abortus* (99; 231). Данный патоген, хотя и является возбудителем преимущественно заболеваний сельскохозяйственных животных, тем не менее, представляет опасность и для людей. Лицензированной вакцины, защищающей людей от инфицирования бактериями рода *Brucella*, в настоящий момент нет. Существуют аттенуированные препараты, применяемые для защиты крупного (S19 и RB51) и мелкого (Rev1) рогатого скота (232), которые значительно снижают уровень заболеваемости бруцеллезом среди животных, а тем самым - и людей, контактирующих с ними. Однако эти вакцины являются патогенными для человека, обладают остаточной токсичностью для животных и не защищают ото всех известных видов возбудителя. В связи с этим в настоящее время в стадии разработки находятся сразу несколько типов

человеческих вакцин против бруцеллеза. Первый тип - это рекомбинантные белковые вакцины, которые обладают такими преимуществами, как высокие эффективность и степень очистки, четко определенный набор компонентов и отсутствие вирулентности (233-234). Однако для усиления иммунного эффекта им необходимы адьюванты, выбор которых имеет ключевое значение для реализации иммунного потенциала (235). Второй тип - ДНК-вакцины, которые экономичны и могут вызывать мощные реакции по типу Т-хелперов 1 типа и цитотоксических Т-клеток. Однако при тестировании этих вакцин на более крупных моделях животных и тем более на людях возникают проблемы с масштабированием (236). Третий тип - новые живые аттенуированные вакцины против бруцеллеза, с дальнейшими мутациями, ослабляющими действие возбудителя на организм. Хотя защитный эффект подобных препаратов уже был подтвержден для крупных животных, для них крайне необходим баланс между эффективностью и безопасностью, поскольку чрезмерные мутации могут привести к снижению протективных качеств. Кроме того, следует отметить, что для всех манипуляций с культурами требуется оборудование высокого уровня биобезопасности из-за риска аэрозольной передачи бруцелл, что существенно усложняет работу с аттенуированными штаммами и повышает стоимость подобного рода разработок. Биоконъюгатные препараты как следующий этап развития ПКВ обладают большей частью преимуществ, перечисленных выше, вместе с тем механизм их воздействия на иммунную систему человека уже достаточно хорошо изучен, а цикл производства, в отличие от классических ПКВ, относительно недорог и состоит из меньшего количества этапов. Дополнительным плюсом, упрощающим производство именно биоконъюгатных вакцин против бруцеллеза, является то обстоятельство, что О-полисахариды *Brucella* схожи с таковыми у *Y. enterocolitica* и состоят в основном из мономера N-формил-перозамина (237), что позволяет использовать *Y. enterocolitica* в качестве организма-продуцента без клонирования в его геном кластера синтеза полисахаридов, свойственного

*Brucella*. Вместе с тем *Y. enterocolitica* остается оппортунистическим патогеном, и при работе с ним также требуется высокий уровень биобезопасности, в связи с чем нередко гены *Y. enterocolitica* клонируют в более безопасные и удобные организмы-продуценты для синтеза гликозилированных по бруцеллльному типу гликопротеинов. В настоящий момент в высокой степени готовности находятся прототипы вакцин на основе холерного токсина В в качестве белкового носителя и О-полисахаридов *Y. enterocolitica*, синтезируемых в генетически модифицированных *E.coli* (231), а также на основе наночастиц Nano-B5 в качестве платформы и О-полисахаридов *Brucella* ( $\alpha 1,2$ - или, в зависимости от конкретного вида, -  $\alpha 1,3$ -4,6-дидезокси-4-формамидо-D-маннопиранозилы) в качестве полисахаридного антигена (238), продуцентом в данном случае является *Y. enterocolitica*. В обеих вакцинах использована О-гликозилирующая система с центральной ОСТ PglL из *N.meningitides*. В обоих случаях исследователи сообщают об успешном применении полученных прототипов в преклинических исследованиях на мышах, где при введении их животным наблюдались отчетливые иммунные реакции, сопровождающиеся как повышенной продукцией антител, так и активацией клеточного иммунитета. Кроме того, оба прототипа продемонстрировали яркий защитный эффект при иммунизации с последующим заражением мышей, в случае нановакцины - даже против нескольких видов *Brucella*. Дальнейшие клинические исследования, очевидно, покажут применимость полученных препаратов для иммунизации людей.

Одним из направлений, где применение технологий PGCT представляется крайне многообещающим, является создание вакцин для животных. Поскольку в современном животноводстве всячески стараются снизить применение антибиотиков из боязни дальнейшего распространения антибиотикорезистентности, потребность в недорогих и эффективных вакцинах для животных будет только расти. Рынок животноводческих вакцин к 2026 году по прогнозам должен составлять 13,4 млрд. долларов США (239).

В частности, как уже упоминалось, ведутся разработки новых вакцин против бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота (*Brucella spp*), а также исследователи работают над созданием иммунных препаратов для профилактики кампилобактериоза, часто поражающего домашнюю птицу (*C.jejuni*). Поскольку рынок ветеринарных вакцин еще только начинает развиваться, это направление выглядит очень удачным для вывода на продажу новых вакцин, созданных с применением экспериментальных технологий. Существенно менее сложные и дорогие биоконъюгатные вакцины, в том числе аттенуированные штаммы, способные экспрессировать гликоконъюгаты *in vivo* (63,240) с потенциальной возможностью дальнейшей регуляции экспрессии в зависимости от окружения (концепция отложенной регулируемой экспрессии, 241), могут оказаться самым удачным вариантом для защиты сельскохозяйственных животных и птиц. Так, Mauri et al. в 2021 г. сообщили о разработке прототипа трехвалентной вакцины для кур на базе технологии PGCT (242). Вакцина представляет собой аттенуированный штамм птичьей патогенной *E.coli* (APES), содержащий копию локуса *C. jejuni* *pgI* в своем геноме и кодируемый плазмидой акцепторный белок - анатоксин *Clostridium perfringens* NetB. Потенциально данная разработка должна была вызывать защиту от инфицирования сразу тремя патогенами - APES, *C. perfringens*, *C. jejuni*. Было продемонстрировано, что штамм способен экспрессировать NetB, гликозилированный гептасахаридным антигеном *C. jejuni*. Вакцина успешно уменьшала колонизацию легких гомологичным серотипом APES при экспериментальном заражении птиц, но в отношении кампилобактерий такого результата достигнуто не было - степень колонизации снижалась, но не на статистически значимом уровне, в связи с чем авторы предприняли попытку увеличить степень гликозилирования белков-носителей в следующей работе путем дальнейшей модификации аттенуированного штамма-продуцента *E.coli* (243). Параллельно с этим ведутся работы по оценке влияния на итоговую эффективность вакцины разных белков-носителей, таких как FlpA и SodB, а также степени их

гликозилирования (244-245). Последующие публикации позволят выяснить, какие именно комбинации покажут наибольшую эффективность в защите птиц от кампилобактериоза.

Пристальное изучение механизмов гликозилирования привлекло внимание исследователей к еще одному очень примечательному обстоятельству. Длительное время считалось, что полисахариды не являются Т-клеточными антигенами, и что молекулы МНС способны презентировать только пептиды. Эта догма была впервые оспорена много лет назад Ishioka et al., которые представили доказательства того, что гликозилирование Т-клеточного эпитопа не обязательно приводит к нарушению распознавания Т-клетками (246). Более поздние исследования указывают на то, что некоторые Т-клетки (называемые Т-carbs) распознают углеводно-пептидные эпитопы, экспонированные на МНСII антигенпрезентирующими клетками, и вырабатывают антитела в ответ на три широко используемые гликоконъюгированные вакцины (247-249). Хотя очевидно, что требуется дальнейшая работа для изучения относительного вклада распознающих полисахариды Т-клеток в эффективность вакцин, эти исследования наглядно демонстрируют, что расположение и длина гликанов, присоединенных к белку, могут иметь значение при стимуляции Т-клеток. Следовательно, возможно повышение иммуногенности гликоконъюгированных вакцин путем исследования и оптимизации участков прикрепления гликанов, их длины и степени полимеризации (250). Биоконъюгация каноническими OST, такими как CjPglB, обеспечивает чрезвычайно специфическое присоединение сахара, что позволяет точно контролировать структуру гликоконъюгата. Дальнейшие исследования в области специфических свойств каждого фермента позволят создать своего рода библиотеки белков-носителей, по которым можно будет подбирать наиболее удачный вариант носителя для каждого конкретного препарата (92).

Резюмируя, можно сказать, что технологии PGCT, при всех их достоинствах, все же имеют ряд значительных ограничений и вряд ли полностью заместят методы традиционной химической конъюгации. Но они, несомненно, могут удачно дополнять их, позволяя расширять наши знания об иммунных процессах, создавать новые эффективные и доступные вакцины и увереннее противостоять новым биологическим вызовам.

### Список литературы

1. Parke J.C., Schneerson R., Robbins J.B. et al. Interim report of a controlled field trial of immunization with capsular polysaccharides of *Haemophilus influenzae* type b and group C *Neisseria meningitidis* in Mecklenburg county, North Carolina (March 1974-March 1976) // J. Infect. Dis. - 1977. - Vol. 136. - P. 51–56.
2. Martin P., Alaimo C. The ongoing journey of a *Shigella* bioconjugate vaccine // Vaccines. - 2022. - Vol. 10. - P. 212. doi.org/10.3390/vaccines10020212.
3. Cavallari M., de Libero G. From immunologically archaic to neoteric glycovaccines // Vaccines. - 2017. - Vol. 5. - P. 4. doi:10.3390/vaccines5010004.
4. Коровкина Е.С., Костинов М.П. Современные конъюгированные вакцины, применяемые для профилактики менингококковой инфекции // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение - 2018. - Т. 7, № 1. - С. 60-68.
5. Перминова О.А., Романенко В.В., Родникова В.Ю. и др. Безопасность и иммуногенность 4-валентной конъюгированной менингококковой вакцины (MenACWY-D) для детей в возрасте от 9 до 23 месяцев в РФ: результаты российской части международного исследования в России и Индии // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2020. - Т 19, № 2. - С:70-78.
6. Зайцев А.Е., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б. и др. Иммунологические и эпидемиологические аспекты иммуногенности капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 в составе пневмококковых вакцин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2020. - №:1. - С 72-82.

7. Савкина М.В., Кривых М.А., Гаврилова Н.А. и др. Обзор мирового опыта применения зарегистрированных вакцин и разработки новых вакцин для профилактики пневмококковой инфекции // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2021. - Т. 21, № 4. - С. 234-243.
8. Sari R.F., Fadilah F., Maladan Y. et al. A narrative review of genomic characteristics, serotype, immunogenicity, and vaccine development of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide // Clin. Exp. Vaccine Res. - 2024. - Vol. 13, Suppl. 2. - P. 91-104.
9. Szymanski C.M., Yao R., Ewing C.P. et al. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni* // Mol. Microbiol. - 1999. - Vol. 32. - P. 1022–1030.
10. Linton D., Allan E., Karlyshev A.V. et al. Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni* // Mol. Microbiol. - 2002. - Vol.43. - P. 497–508.
11. Kowarik M., Numao S., Feldman M.F. et al. N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase // Science. - 2006. - Vol. 314. - P. 1148–1150.
12. Bacon D.J., Szymanski C.M., Burr D.H. et al. A phasevariable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81–176 // Mol. Microbiol. - 2001. - Vol. 40. - P.769–777.
13. Wacker M., Linton D., Hitchen P.G. et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli* // Science. - 2002. - Vol. 298. - P. 1790–1793.
14. Chen M.M., Weerapana E., Ciepichal E. et al. Polyisoprenol specificity in the *Campylobacter jejuni* N-linked glycosylation pathway // Biochemistry. - 2007. - Vol. 46. - P. 14342–14348.
15. Glover K.J., Weerapana E., Numao S. et al. Chemoenzymatic synthesis of glycopeptides with PglB, a bacterial oligosaccharyl transferase from *Campylobacter jejuni* // Chem. Biol. - 2005. - Vol. 12. - P. 1311–1315.

16. Kelly J., Jarrell H., Millar L. et al. Biosynthesis of the N-linked glycan in *Campylobacter jejuni* and addition onto protein through block transfer // J. Bacteriol. - 2006. - Vol. 188. - P. 2427–2434.
17. Reid C.W., Stupak J., Chen M.M. et al. Affinity-capture tandem mass spectrometric characterization of polyprenyl-linked oligosaccharides: tool to study protein N-glycosylation pathways // Anal. Chem. - 2008. - Vol. 80. - P. 5468–5475.
18. Young N.M., Brisson J.R., Kelly J. et al. Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni* // J. Biol. Chem. - 2002. - Vol. 277. - P. 42530–42539.
19. Vijayakumar S., Merkx-Jacques A., Ratnayake D.B. et al. Cj1121c, a novel UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc C-4 aminotransferase essential for protein glycosylation and virulence in *Campylobacter jejuni* // J. Biol. Chem. - 2006. - Vol. 281. - P. 27733–27743.
20. Linton D., Dorrell N., Hitchen P.G et al. Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* N-linked protein glycosylation pathway // Mol. Microbiol. - 2005. - Vol. 55. - P. 1695–1703.
21. Olivier N.B., Chen M.M., Behr J.R. et al. In vitro biosynthesis of UDP-N,N'-diacetylbaucillosamine by enzymes of the *Campylobacter jejuni* general protein glycosylation system // Biochem. - 2006. - Vol. 45. - P. 13659–13669.
22. Olivier N.B., Imperiali B. Crystal structure and catalytic mechanism of PglD from *Campylobacter jejuni* // J. Biol. Chem. - 2008. - Vol. 283. - P. 27937–27946.
23. Schoenhofen I.C., McNally D.J., Vinogradov E. et al. Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways // J. Biol. Chem. - 2006. - Vol. 281. P. 723–732.
24. Rangarajan E.S., Ruane K.M., Sulea T. et al. Structure and active site residues of PglD, an N-acetyltransferase from the bacillosamine synthetic pathway required for N-glycan synthesis in *Campylobacter jejuni* // Biochem. - 2008. - Vol. 47. - P. 1827–1836.

25. Alaimo C., Catrein I., Morf L. et al. Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides // *EMBO J.* - 2006. - Vol. 25. - P. 967–976.
26. Igura M., Maita N., Kamishikiryo J. et al. Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase // *EMBO J.* - 2008. - Vol. 27. - P. 234–243.
27. Nita-Lazar M., Wacker M., Schegg B. et al. The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation // *Glycobiol.* - 2005. - Vol. 15. - P. 361–367.
28. Weerapana E., Imperiali B. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems // *Glycobiol.* - 2006. - Vol. 16. - P. 91–101.
29. Lizak C., Gerber S., Numao S. et al. X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase // *Nature.* - 2011. - Vol. 474. - P. 350–355.
30. Maita N., Nyirenda J., Igura M. et al. Comparative structural biology of eubacterial and archaeal oligosaccharyltransferases // *J. Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285. - P. 4941–4950.
31. Kowarik M., Young N. M., Numao S. et al. // Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence // *EMBO J.* - 2006b. - Vol. 25. - P. 1957–1966.
32. Lairson L.L., Henrissat B., Davies G.J. et al. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms // *Annu. Rev. Biochem.* - Vol. 77. - P. 521–555.
33. Liu J., Mushegian A. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases // *Protein Sci.* - 2003. - Vol. 12. - P. 1418–1431.
34. Maeda Y., Watanabe R., Harris C.L. et al. PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER // *EMBO.* - 2001. - Vol. 20. - P. 250–261.

35. Terra V.S., Mills D.C., Yates L.E. et al. Recent developments in bacterial protein glycan coupling technology and glycoconjugate vaccine design // *J. of Med. Microbiol.* - 2012. - Vol. 61. - P.919-926.
36. Wacker M., Feldman M.F., Callewaert N. et al. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 2006. - Vol. 103. - P. 7088–7093.
37. Schwarz F., Lizak C., Fan Y.Y. et al. Relaxed acceptor site specificity of bacterial oligosaccharyltransferase in vivo // *Glycobiol.* - 2011. - Vol. 21. - P. 45–54.
38. Helenius A., Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans // *Science.* - 2001. - Vol. 291. - P. 2364–2369.
39. Herrmann J.L., O’Gaora P., Gallagher A. et al. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis* // *EMBO J.* - 1996. - Vol. 15. - P. 3547–3554.
40. Baar C., Eppinger M., Raddatz G. et al.: Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 2003. - Vol. 100. - P. 11690–11695.
41. Langdon R.H., Cuccui J., Wren B.W. N-linked glycosylation in bacteria: an uninspected application // *Fut. Microbiol.* - 2009. - Vol. 4, Suppl. 4. - P.401-412.
42. Jervis A.J., Langdon R., Hitchen P. et al. Characterization of N-linked protein glycosylation in *Helicobacter pullorum* // *J. Bacteriol.* - 2010. - Vol. 192. - P. 5228–5236.
43. Ielmini M.V., Feldman M.F. *Desulfovibrio desulfuricans* PglB homolog possesses oligosaccharyltransferase activity with relaxed glycan specificity and distinct protein acceptor sequence requirements // *Glycobiol.* - 2011. - Vol. 21. - P. 734–742.
44. Nakagawa S., Takaki Y., Shimamura S. et al. Deep-sea vent  $\epsilon$ -proteobacterial genomes provide insights into emergence of pathogens // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 2007. - Vol. 104. - P. 12146–12150.

45. Campbell B.J., Engel A.S., Porter M.L. et al. The versatile  $\epsilon$ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2006. - Vol. 4. - P. 458–468.
46. Ewing C.P., Andreishcheva E., Guerry P. Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81-176 // *J. Bacteriol.* - 2009. - Vol. 191. - P. 7086–7093.
47. Castric P. pilO, a gene required for glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin // *Microbiol.* - 1995. - Vol. 141. - P. 1247–1254.
48. Stimson E., Virji M., Makepeace K. et al. () Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose // *Mol. Microbiol.* - 1995. - Vol. 17. - P. 1201–1214.
49. Egge-Jacobsen W., Salomonsson E.N., Aas F.E. et al. (). O-linked glycosylation of the PilA pilin protein of *Francisella tularensis*: identification of the endogenous protein-targeting oligosaccharyltransferase and characterization of the native oligosaccharide // *J. Bacteriol.* - 2011. - Vol. 193. - P. 5487–5497.
50. Harding C.M., Nasr M.A., Kinsella R.L. et al. *Acinetobacter* strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins // *Mol. Microbiol.* - 2015. - Vol. 96. - P. 1023–1041.
51. Faridmoayer A., Fentabil M.A., Mills D.C. et al. Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation // *J. Bacteriol.* - 2007. - Vol. 189. - P. 8088–8098.
52. Power P.M., Seib K.L., Jennings M.P. Pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis* occurs by a similar pathway to wzy-dependent O-antigen biosynthesis in *Escherichia coli* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2006. - Vol. 347. - P. 904–908.
53. Faridmoayer A., Fentabil M.A., Haurat M.F. et al. Extreme substrate promiscuity of the *Neisseria* oligosaccharyl transferase involved in protein O-glycosylation // *J. Biol. Chem.* - 2008. - Vol. 283. - P. 34596–34604.

- 54.** Harding C.M., Nasr M.A., Scott N.E. et al. A platform for glycoengineering a polyvalent pneumococcal bioconjugate vaccine using *E. coli* as a host // Nat. Commun. - 2019. - Vol. 10. - P. 1023–1041.
- 55.** Feldman M.F., Mayer Bridwell A.E., Scott N.E. et al. A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent *Klebsiella pneumonia* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2019. - Vol. 116. - P. 18655–18663.
- 56.** Grass S., Buscher A.Z., Swords W.E. et al. The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis // Mol. Microbiol. - 2003. - Vol. 48. - P. 737–751.
- 57.** St Geme J.W. III, Falkow S., Barenkamp S.J. Highmolecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenza* mediate attachment to human epithelial cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1993. - V. 90. - P. 2875–2879.
- 58.** St Geme J.W. III, Kumar V.V., Cutter D. et al. Prevalence and distribution of the hmw and hia genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable *Haemophilus influenza* // Infect. Immun. - 1998. - Vol. 66. - P. 364–368.
- 59.** Gross J., Grass S., Davis A.E. et al. The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is a glycoprotein with an unusual N-linked carbohydrate modification // J. Biol. Chem. - 2008. - Vol. 283. - P. 26010–26015.
- 60.** Choi K.J., Grass S., Paek S. et al. (). The *Actinobacillus pleuropneumoniae* HMW1C-like glycosyltransferase mediates N-linked glycosylation of the *Haemophilus influenza* HMW1 adhesin // PLoS ONE. - 2010. - Vol. 5. - e15888
- 61.** Fisher A.C., Haitjema C.H., Guarino C. et al. (). Production of secretory and extracellular N-linked glycoproteins in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. - 2011. - Vol. 77. - P. 871–881.
- 62.** Reglinski M., Ercoli G., Plumptre C. et al. A recombinant conjugated pneumococcal vaccine that protects against murine infections with a similar efficacy to Prevnar-13 // NPJ Vaccines. - 2018. - Vol. 3. - P. 53.

- 63.** Nothaft H., Davis B., Lock Y.Y. et al. Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6. - P. 26511.
- 64.** Marshall L.E., Nelson M., Davies C.H. et al. An O-Antigen glycoconjugate vaccine produced using protein glycan coupling technology is protective in an inhalational rat model of tularemia // *J. Immunol. Res.* - 2018. - Vol. 2018. - 8087916
- 65.** Schutze M.P., Leclerc C., Jolivet M. et al. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines // *J. Immunol.* - 1985. - Vol. 135. - P. 2319–2322.
- 66.** Wacker M., Wang L., Kowarik M. et al. Prevention of *Staphylococcus aureus* infections by glycoprotein vaccines synthesized in *Escherichia coli* // *J. Infect. Dis.* - 2014. - Vol. 209. - P. 1551–1561.
- 67.** Kay E., Cuccui J., Wren B.W. Recent advances in the production of recombinant glycoconjugate vaccines // *NPJ Vaccines.* - 2019. - Vol. 4. - P. 16.
- 68.** Kay E.J., Yates L.E., Terra V.S. et al. Recombinant expression of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides in *Escherichia coli* // *Open Biol.* - 2016. - V. 6. - P. 150243
- 69.** Gibson D.G., Young L., Chuang R.-Y. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases // *Nat. Methods.* - 2009. - Vol. 6. - P. 343–345.
- 70.** Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability // *PLoS One.* - 2008. - Vol. 3. - e3647.
- 71.** Kok S., de Stanton L.H., Slaby T. et al. Rapid and reliable DNA assembly via ligase cycling reaction // *ACS Synth. Biol.* 2014. - Vol. 3. - P. 97–106.
- 72.** Passmore I.J., Faulds-Pain A., Abouelhadid S. et al. A combinatorial DNA assembly approach to biosynthesis of N-linked glycans in *E.coli* // *Glycobiol.* - 2023. - Vol. 33, Suppl. 2. - P. 138–149. doi.org/10.1093/glycob/cwac082
- 73.** Zelcbuch L., Antonovsky N., Bar-Even A. et al. Spanning high-dimensional expression space using ribosome-binding site combinatorics // *Nucl. Acids Res.* - 2013. - Vol. 41, Suppl. 9. - e98. doi.org/10.1093/nar/gkt151

- 74.** Smanski M.J., Bhatia S., Zhao D. et al. Functional optimization of gene clusters by combinatorial design and assembly // *Nat Biotechnol.* 2014. - Vol. 32, Suppl. 12. - P. 1241–1249. doi.org/10.1038/nbt.3063
- 75.** Awan A.R., Blount B.A., Bell D.J. et al. Biosynthesis of the antibiotic nonribosomal peptide penicillinin baker's yeast // *Nat Commun.* - 2017. - Vol. 8, Suppl. 1. - P. 15202. doi.org/10.1038/ncomms15202
- 76.** Taylor G.M., Mordaka P.M., Heap J.T. Start-Stop assembly: a functionally scarless DNA assembly system optimized for metabolic engineering // *Nucl. Acids Res.* - 2019. - Vol. 47, Suppl. 3. - e17. doi.org/10.1093/nar/gky1182.
- 77.** Jiang X., Bai J., Yuan J. et al. High efficiency biosynthesis of O-polysaccharide-based vaccines against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* // *Carbohyd. Pol.* - 2021. - Vol. 255. - P. 117475. doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117475
- 78.** Wang Y., Perepelov A.V., Senchenkova S.N. et al. Glycoengineering directs de novo biomanufacturing of UPEC O21 O-antigen polysaccharide based glycoprotein // *Int. J. of Biol. Macromol.* - 2023. - Vol. 253. - P. 126993. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126993
- 79.** Feldman M.F., Wacker M., Hernandez M. et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci.* - 2005. - Vol. 102. - P. 3016–3021.
- 80.** Lehrer J., Vigeant K.A., Tatar L.D. et al. Functional characterization and membrane topology of *Escherichia coli* WecA, a sugar-phosphate transferase initiating the biosynthesis of enterobacterial common antigen and O-antigen lipopolysaccharide // *J. Bacteriol.* - 2007. - Vol. 189. - P. 2618–2628.
- 81.** Ding N., Fu X., Ruan Y. et al. Extracellular production of recombinant N-glycosylated anti-VEGFR2 monobody in leaky *Escherichia coli* strain // *Biotechnol. Lett.* - 2019. - Vol. 41. - P. 1265–1274.
- 82.** Ding N., Ruan Y., Fu X. et al. Improving production of N-glycosylated recombinant proteins by leaky *Escherichia coli* // *3. Biotech.* - 2019. - Vol. 9. - P. 302.

- 83.** Gu P., Yang F., Su T. et al. A rapid and reliable strategy for chromosomal integration of gene(s) with multiple copies // *Sci. Rep.* - 2015. - Vol. 5. - P. 9684.
- 84.** Abouelhadid S., Atkins E.R., Kay E.J. et al. Development of a novel glycoengineering platform for the rapid production of conjugate vaccines // *Microb. Cell Fact.* - 2023. - Vol. 22. - P. 159. doi.org/10.1186/s12934-023-02125-y
- 85.** Natarajan A., Jaroentomeechai T., Cabrera-Sánchez M. et al. Engineering orthogonal human O-linked glycoprotein biosynthesis in bacteria // *Nat. Chem. Biol.* - 2020. - Vol. 16, Suppl. 10. - P. 1062–1070. doi:10.1038/s41589-020-0595-9
- 86.** Ihssen J., Kowarik M., Dilettoso S. et al. Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli* // *Microb. Cell Fact.* - 2010. - Vol. 9. - Article ID 61. doi.org/10.1186/1475-2859-9-61
- 87.** Cuccui J., Thomas R.M., Moule M.G. et al. Exploitation of bacterial N-linked glycosylation to develop a novel recombinant glycoconjugate vaccine against *Francisella tularensis* // *Open Biol.* - 2013. - Vol. 3, Suppl. 5. - P.130002. doi.org/10.1098/rsob.130002
- 88.** Herbert J.A., Kay E.J., Faustini S.E. et al. Production and efficacy of a low-cost recombinant pneumococcal protein polysaccharide conjugate vaccine // *Vaccine.* - 2018. - Vol. 36, Suppl. 26. - P. 3809. doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.036
- 89.** Koffas M.A.G., Linhardt R.J., Natarajan A. et al. Metabolic engineering of glycoprotein biosynthesis in bacteria // *Emerg Top Life Sci.* - 2018. - Vol. 2, Suppl. 3. - P. 419–32.
- 90.** Strutton B., Jaffe S.R.P., Pandhal J. et al. Producing a glycosylating *Escherichia coli* cell factory: the placement of the bacterial oligosaccharyl transferase pglB onto the genome // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2018. - Vol. 495, Suppl. 1. - P. 686–692. doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.023
- 91.** патент US 2015/0344928A1 от декабря 2015 г, авторы Brendan Wren, London (GB); Jon Cuccui, London (GB); Sherif Abouelhadid, London (GB)

- 92.** Dow J.M., Mauri M., Scott T.A. et al. // Improving protein glycan coupling technology (PGCT) for glycoconjugate vaccine production // *Exp. Rev. of Vaccin.* - 2020. - Vol. 19, Suppl. 6. - P. 507-527. doi.org/10.1080/14760584.2020.1775077
- 93.** Kightlinger W., Duncker K.E., Ramesh A. et al. A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways // *Nat. Commun.* - 2019. - Vol. 10. - P. 5404.
- 94.** Jaroentomeechai T., Stark J.C., Natarajan A. et al. Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery // *Nat. Commun.* - 2018. - Vol. 9, Suppl. 1. - P. 2686.
- 95.** Harding C.M., Feldman M.F. Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli* // *Glycobiol.* - 2019. - Vol. 29. - P. 519–529.
- 96.** Micoli F., Del Bino L., Alfini R. et al. Glycoconjugate vaccines: current approaches towards faster vaccine design // *Exp. Rev Vaccin.* - 2019. - Vol. 18. - P. 1–15.
- 97.** Sun P., Pan C., Zeng M. et al. Design and production of conjugate vaccines against *S. Paratyphi A* using an O-linked glycosylation system in vivo // *NPJ Vaccines.* - 2018. - Vol. 3. - P. 1–9.
- 98.** Iwashkiw J. A., Fentabil M. A., Faridmoayer A. et al. Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and diagnostic tools directed against brucellosis // *Microb. Cell Fact.* - 2012. - Vol. 11. - P. 13.
- 99.** Huang J., Pan C., Sun P. et al. Application of an O-linked glycosylation system in *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 to generate a new candidate vaccine against *Brucella abortus* // *Microorg.* - 2020. - Vol. 8. - P. 436.
- 100.** Liu Y., Li S., Guo Y. et al. Genetic engineering of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 for bioconjugate vaccine applications // *Microorg.* - 2023. - Vol. 11. - P. 1321. doi.org/10.3390/microorganisms11051321
- 101.** Sari R.F., Fadilah F., Maladan Y. et al. A narrative review of genomic characteristics, serotype, immunogenicity, and vaccine development of

- Streptococcus pneumonia* capsular polysaccharide // Clin. Exp. Vaccine Res. - 2024. - Vol. 13, Suppl. 2. - P. 91-104. doi:10.7774/cevr.2024.13.2.91. Epub 2024 Apr 30
- 102.** Ryman J., Sachs J.R., Yee K.L. et al. Predicted effectiveness of V114 vaccine against invasive pneumococcal disease in children // Exp. Rev. Vaccines. - 2022. - Vol. 21, Suppl. 10. - P. 1515-1521. doi 10.1080/14760584.2022.2112179
- 103.** Danelian G., Burton L., Bayley T. et al. The impact and cost-effectiveness of pneumococcal immunisation strategies for the elderly in England // Vaccine. - 2024. - Vol. 42, Suppl. 18. - P. 3838-3850. Epub 2024 May 18. doi 10.1016/j.vaccine.2024.05.001
- 104.** Herbert J.A., Kay E.J., Faustini S.E. et al. Production and efficacy of a low-cost recombinant pneumococcal protein polysaccharide conjugate vaccine // Vaccine. - 2018. - Vol. 36. - P. 3809–3819.
- 105.** Uchiyama S., Carlin A.F., Khosravi A. et al. The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion // J. Exp. Med. - 2009. - Vol. 206. - P. 1845–1852.
- 106.** Brittan J.L., Buckeridge T.J., Finn A. et al. Pneumococcal neuraminidase A: an essential upper airway colonization factor for *Streptococcus pneumonia* // Mol. Oral. Microbiol. - 2012. - Vol. 27. - P. 270–283.
- 107.** Wren J. T., Blevins L.K., Pang B. et al. Pneumococcal neuraminidase A (NanA) promotes biofilm formation and synergizes with influenza A virus in nasal colonization and middle ear infection // Infect. Immun. - 2017. - Vol. 85. e01044–16.
- 108.** Moffitt K.L., Gierahn T.M., Lu Y. et al. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization // Cell. Host. Microbe. - 2011. - Vol. 9. - P. 158–165.
- 109.** Brown J.S., Ogunniyi A.D., Woodrow M.C. et al. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection // Infect. Immun. - 2001. - Vol. 69. - P. 6702–6706.

- 110.** Ogunniyi A.D., Mahdi L.K., Trappetti C. et al. Identification of genes that contribute to the pathogenesis of invasive pneumococcal disease by in vivo transcriptomic analysis // *Infect. Immun.* - 2012. - Vol. 80. - P. 3268–3278.
- 111.** Aceila J., Paschalla A.V., Knoot C.J. et al. Immunogenicity and protective efficacy of a prototype pneumococcal bioconjugate vaccine // *Vaccine.* - 2022. - Vol. 40, Suppl. 42. - P. 6107–6113. doi:10.1016/j.vaccine.2022.09.018
- 112.** Russell N.J., Seale A.C., O’Driscoll M. et al. Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses // *Clin. Infect. Dis.* - 2017. - Vol. 65. - P. 100–111.
- 113.** Seale A.C., Blencowe H., Bianchi-Jassir F. et al. Stillbirth with group B *Streptococcus* disease worldwide: systematic review and meta-analyses // *Clin. Infect. Dis.* - 2017. - Vol. 65. - P. 125–132.
- 114.** Hall J., Adams N.H., Bartlett L. et al. Maternal disease with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses // *Clin. Infect. Dis.* - 2017. - Vol. 65. - P. 112–124.
- 115.** Madrid L., Seale A.C., Kohli-Lynch M. et al. Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic review and meta-analyses // *Clin. Infect. Dis.* - 2017. - Vol. 65. -P. 160–172.
- 116.** Seale A.C., Bianchi-Jassir F., Russell N.J. et al. Estimates of the burden of Group B Streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children // *Clin. Infect. Dis.* - 2017. - Vol. 65. - P. 200–219.
- 117.** Мелкумян А.Р., Цибин А.Н., Латыпова М.Ф. и др. Распространенность СГВ - инфекций среди новорожденных г. Москвы. Тезисы на VIII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням. 28-30 марта 2016 г. Москва. – С.181
- 118.** McLaughlin J.M., Peyrani P., Furmanek S. et al. Burden of adults hospitalized with group B streptococcal infection. // *J. Infect. Dis.* - 2021. - Vol. 224, Suppl. 7. - P. 1170-1178. doi 10.1093/infdis/jiaa110

- 119.** Baker C.J., Rench M.A., McInnes P. Immunization of pregnant women with group B streptococcal type III capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine // *Vaccine*. - 2003. - Vol. 21. - P. 3468–3472.
- 120.** Banks C., Lindbom B.J., Kitson G. et al. Preclinical development of a novel Group B *Streptococcus* (GBS) vaccine candidate for maternal immunization based upon the alpha-like protein family of GBS surface proteins (Alp) // *Birth. Defect. Res.* - 2023. - Vol. 115, Suppl. 9. - P. 933-944. Epub 2023 Apr 3. doi 10.1002/bdr2.2173
- 121.** Study of a group B *Streptococcus* vaccine in pregnant women living with HIV and in pregnant women who do not have HIV // NCT04596878. - ClinicalTrials.gov. - Accessed 04.09.2024
- 122.** Absalon J., Segall N., Block S.L. et al. Safety and immunogenicity of a novel hexavalent group B *Streptococcus* conjugate vaccine in healthy, non-pregnant adults: a phase 1/2, randomised, placebo-controlled, observer-blinded, dose-escalation trial // *Lancet Infect. Dis.* - 2021. - Vol. 21. - P. 263–274.
- 123.** Duke J.A., Paschall A.V., Robinson L.S. et al. Development and immunogenicity of a prototype multivalent group B *Streptococcus* bioconjugate vaccine // *ACS Infect. Dis.* - 2021. - Vol. 7. - P. 3111–3123. doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00415
- 124.** Watkins D.A., O’Johnson C., Colquhoun S.M. et al. Global, regional, and national burden of rheumatic heart disease, 1990–2015 // *N. Engl. J. Med.* - 2017. - Vol. 377. - P. 713–722.
- 125.** Herdman M.T., Cordery R., Karo B. et al. Clinical management and impact of scarlet fever in the modern era: findings from a cross-sectional study of cases in London, 2018-2019 // *BMJ Open*. - 2021. - Vol. 11, Suppl. 12. e057772. doi: 10.1136/bmjopen-2021-057772
- 126.** Rümke L.W., de Gier B., Vestjens S.M.T. et al. Dominance of M1UK clade among Dutch M1 *Streptococcus pyogenes* // *Lancet Infect. Dis.* - 2020. - Vol. 20. - P. 539–540.

127. Davies M.R., MacIntyre L., Mutreja A. et al. Atlas of Group A Streptococcal vaccine candidates compiled using large-scale comparative genomics // *Nat. Genet.* - 2019. - Vol. 51. - P. 1035–1043.
128. van Sorge N.M., Cole J.N., Kuipers K. et al. The classical Lancefield antigen of Group A *Streptococcus* is a virulence determinant with implications for vaccine design // *Cell Host Microb.* - 2014. - Vol. 15. - P. 729–740.
129. Kabanova A., Margarit I., Berti F. et al. Evaluation of a group A *Streptococcus* synthetic oligosaccharide as vaccine candidate // *Vaccine.* - 2010. - Vol. 29. - P. 104–114.
130. Rush J.S., Edgar R.G., Deng P. et al. The molecular mechanism of N-acetylglucosamine side-chain attachment to the Lancefield Group A carbohydrate in *Streptococcus pyogenes* // *J. Biol. Chem.* - 2017. - Vol. 292. - P. 19441–19457.
131. van der Beek S. L., Le Breton Y., Ferenbach A.T. et al. GacA is essential for Group A *Streptococcus* and defines a new class of monomeric dTDP-4-dehydrorhamnose reductases (RmlD) // *Mol. Microbiol.* - 2015. - Vol. 98. - P. 946–962.
132. Henningham A., Davies M.R., Uchiyama S. et al. Virulence role of the GlcNAc side chain of the Lancefield cell wall carbohydrate antigen in non-M1-serotype Group A *Streptococcus* // *MBio.* - 2018. - Vol. 9. - P. 1–12.
133. Sabharwal H., Michon F., Nelson D. et al. Group A *Streptococcus* (GAS) carbohydrate as an immunogen for protection against GAS infection // *J. Infect.* 2006. - Vol. 193. - P. 129–135.
134. Salvadori L. G., Blake M. S., Mccarty M. Group A *Streptococcus*-liposome ELISA antibody titers to group a polysaccharide and opsonophagocytic capabilities of the antibodies // *J. Immunol.* - 1995. - Vol. 171. - P. 593–600.
135. Di Benedetto R., Mancini F., Carducci M. et al. Rational design of a glycoconjugate vaccine against Group A *Streptococcus* // *Int. J. Mol.* - 2020. - Vol. 21, Suppl. 22. - P. 1–21.

- 136.** Burns K., Dorfmüller H.C., Wren B.W. et al. Progress towards a glycoconjugate vaccine against Group A *Streptococcus* vaccines // NPJ Vaccines. - 2023. - Vol. 8, Suppl. 1. - P. 48. doi.org/10.1038/s41541-023-00639-5
- 137.** CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. 2019
- 138.** Follador R., Heinz E., Wyres K.L. et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides // Microb Genom. - 2016. - Vol. 2, Suppl. 8. e000073
- 139.** Wantuch P.L., Knoot C.J., Robinson L.S. et al. Capsular polysaccharide inhibits vaccine-induced O-antigen antibody binding and function across both classical and hypervirulent K2:O1 strains of *Klebsiella pneumoniae* // PLoS Pathog. - 2023. - Vol. 19, Suppl. 5. e101136
- 140.** Liu Y., Pan C., Wang K. et al. Preparation of a *Klebsiella pneumoniae* conjugate nanovaccine using glycol-engineered *Escherichia coli* // Microb. Cell Fact. - 2023. - Vol. 22, Suppl. 95 - P. 1-13. doi.org/10.1186/s12934-023-02099-x
- 141.** Raso M.M., Arato V., Gasperini G. et al. Toward a *Shigella* vaccine: opportunities and challenges to fight an antimicrobial-resistant pathogen // Int. J. Mol. Sci. - 2023. - Vol. 24. - P. 4649. https://doi.org/10.3390/ijms24054649
- 142.** DuPont H.L., Levine M.M., Hornick R.B. et al. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission // J. Infect. Dis. - 1989. - Vol. 159. - P. 1126–1128.
- 143.** Kotloff K.L., Nataro J.P., Blackwelder W.C. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study // Lancet. - 2013. - Vol. 382. - P. 209–222.
- 144.** Platts-Mills J.A., Liu J., Rogawski E.T. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: A reanalysis of the MAL-ED cohort study // Lancet Glob. Health. - 2018. - Vol. 6. P. 1309–1318

- 145.** GBD. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet*. - 2020. - Vol. 396. - P. 1204–1222.
- 146.** Lopez-Velez R., Lebens M., Bundy L. et al. Bacterial travellers' diarrhoea: a narrative review of literature published over the past 10 years // *Travel Med. Infect. Dis.* - 2022. - Vol. 47. - P. 102293.
- 147.** Rogawski E.T., Liu J., Platts-Mills J.A. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study // *Lancet Glob. Health*. - 2018. - Vol. 6. - P. 1319.
- 148.** Nasrin D., Blackwelder W.C., Sommerfelt H. et al. Pathogens associated with linear growth faltering in children with diarrhea and impact of antibiotic treatment: the global enteric multicenter study // *J. Infect. Dis.* - 2021. - Vol. 224. - P.848
- 149.** Kotloff K.L., Riddle M.S., Platts-Mills J.A. et al. Shigellosis // *Lancet*. - 2018. - Vol. 391. - P. 801.
- 150.** Tickell K.D., Brander R.L., Atlas H.E. et al. Identification and management of *Shigella* infection in children with diarrhea: A systematic review and meta-analysis // *Lancet Glob. Health*. - 2017. - Vol 5, Suppl. 12. - P. 1235-1248.
- 151.** MacLennan C.A, Steele A.D. Frontiers in *Shigella* vaccine development // *Vaccin.* - 2022. - Vol. 10. - P. 1536. doi.org/10.3390/vaccines10091536
- 152.** WHO. WHO Publishes List of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available online: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed on 01.10.2024)
- 153.** The H.C., Rabaa M.A., Thanh D.P. et al. South Asia as a reservoir for the global spread of ciprofloxacin-resistant *Shigella sonnei*: a cross-sectional study // *PLoS Med.* - 2016. - Vol. 13. e1002055
- 154.** Mel D.M., Arsic B.L., Nikolic B.D. et al. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 4. Oral immunization with live monotypic and combined vaccines // *Bull. World Health Organ.* - 1968. - Vol. 39. - P. 375.

- 155.** Mel D., Gangarosa E.J., Radovanovic M.L. et al. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 6. Protection of children by oral immunization with streptomycin-dependent *Shigella* strains // Bull. World Health Organ. - 1971. - Vol. 45. - P. 457–464.
- 156.** Cohen D., Ashkenazi S., Green M.S. et al. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults // Lancet. - 1997. - Vol. 349. - P. 155–159.
- 157.** Passwell J.H., Ashkenazi S., Banet-Levi Y. et al. Age-related efficacy of *Shigella* O-specific polysaccharide conjugates in 1-4-year-old Israeli children // Vaccine. - 2010. - Vol. 28. - P. 2231–2235.
- 158.** Абрамцева М.В., Неманова Е.О., Алехина Н.С. Перспективные направления разработки вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза // Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. - 2022. - Vol. 22, Suppl. 3. - P. 249 - 265.
- 159.** Ledov V.A., Golovina M.E., Markina A.A. et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection // Vaccine. - 2019. - Vol. 37, Suppl. 8. - P. 1062–1072. doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.067
- 160.** Протокол ФКК-III-07/18. Открытое несравнительное исследование безопасности и иммуногенности вакцины ФЛЕКСВАК® на добровольцах в возрасте 18–60 лет. 04.04.2019–01.12.2020. Реестр Клинических исследований. <https://clinline.ru/reestr-klinicheskijh-issledovaniy/161-04.04.2019.html>
- 161.** MacLennan C.A., Grow S., Ma L. et al. The *Shigella* vaccines pipeline // Vaccin. - 2022. - Vol. 10. - P. 1376. doi.org/10.3390/vaccines10091376
- 162.** Caboni M., Pedron T., Rossi O. et al. An O antigen capsule modulates bacterial pathogenesis in *Shigella sonnei* // PLoS Pathog. - 2015. - Vol. 11. e1004749
- 163.** Formal S.B., Oaks E.V., Olsen R.E. et al. Effect of prior infection with virulent *Shigella flexneri* 2a on the resistance of monkeys to subsequent infection with *Shigella sonnei* // J. Infect. Dis. - 1991. - Vol. 164. - P. 533–537.

- 164.** DuPont H.L., Hornick R.B., Snyder M.J. et al. Immunity in shigellosis. II. Protection induced by oral live vaccine or primary infection // *J. Infect. Dis.* - 1972. - Vol. 125. - P. 12–16.
- 165.** Cohen D., Bassal R., Goren S. et al. Recent trends in the epidemiology of shigellosis in Israel // *Epidemiol. Infect.* - 2014. - Vol. 142. - P. 2583–2594.
- 166.** Livio S., Strockbine N.A., Panchalingam S. et al. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development // *Clin. Infect. Dis.* - 2014. - Vol. 59. - P. 933–941.
- 167.** Noriega F.R., Liao F.M., Maneval D.R. et al. Strategy for cross-protection among *Shigella flexneri* serotypes // *Infect. Immun.* - 1999. - Vol. 67. - P. 782–788.
- 168.** Ravenscroft N., Haeuptle M.A., Kowarik M. et al. Purification and characterization of a *Shigella* conjugate vaccine, produced by glycoengineering *Escherichia coli* // *Glycobiol.* - 2016. - Vol. 26. - P. 51–62.
- 169.** Hatz C.F.R., Bally B., Rohrer S. et al. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella dysenteriae* type 1 administered to healthy adults: A single blind, partially randomized Phase I study // *Vaccine.* - 2015. - Vol. 33. - P. 4594–4601.
- 170.** Riddle M.S., Kaminski R.W., Di Paolo C. et al. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a administered to healthy adults: a single-blind, randomized phase I study // *Clin. Vaccine Immunol.* - 2016. - Vol. 23. - P. 908–917.
- 171.** Talaat K.R., Alaimo C., Martin P. et al. Human challenge study with a *Shigella* bioconjugate vaccine: analyses of clinical efficacy and correlate of protection // *EBioMedicine.* - 2021. - Vol. 66. - P. 103310.
- 172.** Clarkson K.A., Talaat K.R., Alaimo C. et al. Immune response characterization in a human challenge study with a *Shigella flexneri* 2a bioconjugate vaccine // *EBioMedicine.* - 2021. Vol. 66. - P. 103308.
- 173.** Clarkson K.A., Porter C.K., Talaat K.R. et al. *Shigella*-specific immune profiles induced after parenteral immunization or oral challenge with either *Shigella flexneri* 2a or *Shigella sonnei* // *mSphere.* - 2021. - Vol. 6, Suppl. 4. e0012221

- 174.** A study to determine if a new *Shigella* vaccine is safe, induces immunity and the best dose among Kenyan infants // NCT04056117. - ClinicalTrials.gov. - Accessed on 30.08.2024)
- 175.** Lu T., Das S., Howlader D.R. et al. *Shigella* vaccines: the continuing unmet challenge // Int J Mol Sci. - 2024. - Vol.25, Suppl. 8. - P. 4329. doi: 10.3390/ijms25084329
- 176.** Bassetti M., Nicco E., Mikulska M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? // Int J Antimicrob Agents. - 2009. - Vol. 34, Suppl 1. - P.15–19.
- 177.** Solanki V., Tiwari M., Tiwari V. Subtractive proteomic analysis of antigenic extracellular proteins and design a multi-epitope vaccine against *Staphylococcus aureus* // Microbiol and Immunol. - 2021. - Vol. 65. - P. 302–316. doi: 10.1111/1348-0421.12870
- 178.** Tan Z., Yang W., O'Brien N.A. et al. A comprehensive synthetic library of poly-Nacetyl glucosamines enabled vaccine against lethal challenges of *Staphylococcus aureus* // Nat. Commun. - 2024. - Vol. 15. - P. 3420. doi.org/10.1038/s41467-024-47457-4
- 179.** Tärnvik A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis* // Rev Infect Dis. - 1989. - Vol. 11. - P. 440–451.
- 180.** McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.-A.H. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare // Annu Rev Microbiol. - 2006. - Vol. 60. - P. 167–185.
- 181.** Oyston P.C.F., Quarry J.E. Tularemia vaccine: past, present and future // Antonie van Leeuwenhoek. - 2005. - Vol. 87. - P. 277–281.
- 182.** Conlan J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* – past, present and future // Expert Rev Vaccines. - 2004. - Vol. 3. - P. 307–314.
- 183.** Conlan J.W., Shen H., Webb A. et al. Mice vaccinated with the O-antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol

challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen // *Vaccine*. - 2002. - Vol. 20. - P. 3465–3471.

**184.** Fulop M., Mastroeni P., Green M. et al. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis* // *Vaccine*. - 2001. - Vol. 19. - P. 4465–4472.

**185.** Sebastian S. et al. Cellular and humoral immunity are synergistic in protection against types A and B *Francisella tularensis* // *Vaccine*. - 2009. - Vol. 27. - P. 597–605.

**186.** Prior J.L., Prior R.G., Hitchen P.G. et al., “Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* // *J. of Med. Microbiol.* - 2003. - Vol. 52, Suppl. 10. - P. 845–851.

**187.** Rojas-Lopez M., Monterio R., Pizza M. et al. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: insights for vaccine development // *Front. Microbiol.* - 2018. - Vol. 9. - P. 440. doi:10.3389/fmicb.2018.00440

**188.** Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli* // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2004. - Vol. 2. - P. 123–140. doi: 10.1038/nrmicro818;

**189.** Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2010. - Vol. 8. - P. 26–38. doi: 10.1038/nrmicro2265

**190.** Su C, Brandt L.J *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans // *Ann. Intern. Med.* 1995. - Vol. 123. - P. 698–714.

**191.** Karpman D., Connell H., Svensson M. et al. The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection // *J. Infect. Dis.* - 1997. - Vol. 175. - P. 611–620.

**192.** Raghupathy P., Date A., Shastry J.C. et al. Haemolytic-uraemic syndrome complicating shigella dysentery in south Indian children // *Br. Med. J.* - 1978. - Vol. 1. - P. 1518–1521.

**193.** Wong C.S., Jelacic S., Habeeb R.L. et al. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections // *N. Engl. J. Med.* - 2000. - Vol. 342. - P. 1930–1936.

- 194.** Goldwater P.N., Bettelheim K.A. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS) // BMC Med. - 2012. - Vol. 10. - P. 12
- 195.** Ma Z., Zhang H., Shang W. et al. Glycoconjugate vaccine containing *Escherichia coli* O157: H7O-antigen linked with maltose-binding protein elicits humoral and cellular responses. // Tregoning JS, editor. PLoS One. - 2014. - Vol. 9. e105215
- 196.** Fernandez S., Palmer D.R., Simmons M. et al. Potential role for Toll-like receptor 4 in mediating *Escherichia coli* maltose-binding protein activation of dendritic cells // Infect. Immun. - 2007. - Vol. 75. - P. 1359–1363.
- 197.** Konadu E.Y., Parke J.C.Jr., Tran H.T. et al. Investigational vaccine for *Escherichia coli* O157: phase 1 study of O157 O-specific polysaccharide-*Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A conjugates in adults // J. Infect. Dis. - 1998. - Vol. 177. - P. 383–387.
- 198.** Konadu E., Donohue-Rolfe A., Calderwood S.B. et al. Syntheses and immunologic properties of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide and Shiga toxin 1 B subunit conjugates in mice // Infect. Immun. - 1999. - Vol. 67. - P. 6191–6193.
- 199.** Ma Z., Zhang H., Wang P.G. et al. Peptide adjacent to glycosylation sites impacts immunogenicity of glycoconjugate vaccine // Oncotarget. - 2018. - Vol. 9, Suppl. 1. - P. 75-82.
- 200.** Poolman J.T., Wacker M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field // J. Infect. Dis. - 2016. - Vol. 213, Suppl. 1. - P. 6–13. doi:10.1093/infdis/jiv429
- 201.** Dale A.P., Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones // J. Infect. - 2015. - Vol. 71, Suppl. 6. - P. 615–626. doi:10.1016/j.jinf.2015.09.009
- 202.** Russo T.A., Johnson J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic

problem // *Microbes Infect.* - 2003. - Vol. 5, Suppl. 5. - P. 449–456. doi:10.1016/S1286-4579(03)00049-2

**203.** Foxman B., Brown P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs // *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2003. - Vol. 17, Suppl. 2.- P. 227–241. doi:10.1016/S0891-5520(03)00005-9

**204.** Klein R.D., Hultgren S.J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2020. - Vol. 18, Suppl. 4. - P. 211–226. doi:10.1038/s41579-020-0324-0

**205.** van den Dobbelsteen G.P.J.M., Faé K.C., Serroyen J. et al. Immunogenicity and safety of a tetravalent *E. coli* O-antigen bioconjugate vaccine in animal models // *Vaccine.* - 2016. - Vol. 34, Suppl. 35. - P. 4152–4160. doi:10.1016/j.vaccine.2016.06.067

**206.** Inoue M., Ogawa T., Tamura H. et al. Safety, tolerability and immunogenicity of the ExPEC4V (JNJ-63871860) vaccine for prevention of invasive extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* disease: A phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy Japanese participants // *Hum. Vaccines Immunother.* - 2018. - Vol. 14. - P. 2150–2157.

**207.** Huttner A., Hatz C., van den Dobbelsteen G. et al. Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial // *Lancet Infect. Dis.* - 2017. - Vol. 17. - P. 528–537.

**208.** Frenck R.W., Ervin J., Chu L. et al. Safety and immunogenicity of a vaccine for extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ESTELLA): a phase 2 randomised controlled trial // *Lancet Infect. Dis.* - 2019. - Vol. 19. - P. 631–640.

**209.** Fierro C.A., Sarnecki M., Doua J. et al. Safety, reactogenicity, immunogenicity, and dose selection of 10-valent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* bioconjugate vaccine (VAC52416) in adults aged 60–85 years in a randomized, multicenter, interventional, first-in-human, phase 1/2a study // *Open Forum Infect Dis.* - 2023. - Vol. 10, Suppl. 8. - ofad417. doi:10.1093/ofid/ofad417

- 210.** Huttner A., Gambillara V. The development and early clinical testing of the ExPEC4V conjugate vaccine against uropathogenic *Escherichia coli* // Clin. Microbiol. Infect. - 2018. - Vol. 24, Suppl. 10. - P. 1046–1050. doi:10.1016/j.cmi.2018.05.009
- 211.** Weerdenburg E., Davies T., Morrow B. et al. Global distribution of O serotypes and antibiotic resistance in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* collected from the blood of patients with bacteremia across multiple surveillance studies // Clin. Infect. Dis. - 2023. - Vol. 76, Suppl. 3. - P. 1236–1243. doi:10.1093/cid/ciac421
- 212.** Lindberg U., Hanson L.A., Jodal U. et al. Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls // Acta Paediatr. - 1975. - Vol. 64, Suppl. 3. - P. 432–436. doi:10.1111/j.1651-2227.1975.tb03860.x
- 213.** Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P. et al. Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria // Eur. J. Epidemiol. - 1996. - Vol. 12, Suppl. 2. - P. 191–198. doi:10.1007/BF00145506
- 214.** Qiu L., Chirman D., Clark J.R. et al. Vaccines against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): progress and challenges // Gut Microb. - 2024. - Vol. 16, Suppl. 1. - P. 2359691. doi.org/10.1080/19490976.2024.2359691
- 215.** Stenutz R., Weintraub A., Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens // FEMS Microbiol. Rev. - 2006. - Vol. 30. - P. 382–403.
- 216.** Phan M.-D., Peters K.M., Sarkar S. et al. The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone // PLoS Genet. - 2013. - Vol. 9, Suppl. 10. - e1003834. doi.org/10.1371/journal.pgen.1003834
- 217.** Kowarik M., Wetter M., Haeuptle M.A. et al. The development and characterization of an *E. coli* O25B bioconjugate vaccine // Glycoconjug. J. - 2021. - Vol. 38. - P. 421–435. doi.org/10.1007/s10719-021-09985-9
- 218.** Meltzer E., Schwartz E. Enteric fever: a travel medicine oriented view // Curr. Opin. Infect. Dis. - 2010. - Vol. 23. - P. 432–437.

- 219.** Chandel D.S., Chaudhry R., Dhawan B. et al. Drug-resistant *Salmonella enterica* serotype paratyphi A in India // *Emerg. Infect. Dis.* - 2000. - Vol. 6. - P. 420–421.
- 220.** Martin L.B., Simon R., VacLennan C.A. et al. Status of paratyphoid fever vaccine research and development // *Vaccine.* - 2016. - Vol. 34. - P. 2900–2902.
- 221.** Parge H.E., Forest K.T., Hiskey M.J. et al. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution // *Nature.* - 1995. - Vol. 378. - P. 32–38.
- 222.** Musumeci M.A., Faridmoayer A., Watanabe Y. et al. Evaluating the role of conserved amino acids in bacterial O-oligosaccharyltransferases by in vivo, in vitro and limited proteolysis assays // *Glycobiol.* - 2014. - Vol. 24. - P. 39–50.
- 223.** Pan C., Sun P., Liu B. et al. Biosynthesis of conjugate vaccines using an O-linked glycosylation system // *MBio.* - 2016. - Vol. 7, Suppl. 2. e00443–16
- 224.** Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2005. - Vol. 18. - P. 383–416. doi: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005
- 225.** Silva E.B., Dow S.W. Development of *Burkholderia mallei* and pseudomallei vaccines // *Front. Cell Infect. Microbiol.* - 2013. - Vol. 3. - P. 10. doi:10.3389/fcimb.2013.00010
- 226.** Nandi T., Tan P. (). Less is more: *Burkholderia pseudomallei* and chronic melioidosis // *MBio.* - 2013. - Vol. 4. - P. 00709–00713. doi: 10.1128/mBio.00709-713
- 227.** Knirel Y.A., Paramonov N.A., Shashkov A.S. et al. (). Structure of the polysaccharide chains of *Pseudomonas pseudomallei* lipopolysaccharides // *Carbohydr. Res.* - 1992. - Vol. 233. - P. 185–193. doi: 10.1016/S0008-6215(00)90930-3
- 228.** Perry M.B., Maclean L.L., Schollaardt T. et al. Structural characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Burkholderia pseudomallei* // *Infect. Immun.* - 1995. - Vol. 63. - P. 3348–3352.
- 229.** DeShazer, D., Brett, P. J., Woods, D. E. (). The type II O-antigenic polysaccharide moiety of *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide is required

for serum resistance and virulence // *Mol. Microbiol.* - 1998. - Vol. 30. - P. 1081–1100. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01139.x

**230.** Garcia-Quintanilla F., Iwashkiw J.A., Price N.L. et al. Production of a recombinant vaccine candidate against *Burkholderia pseudomallei* exploiting the bacterial N-glycosylation machinery // *Front Microbiol.* - 2014. - Vol. 5. - P. 381.

**231.** Li S., Huang J., Wang K. et al. A bioconjugate vaccine against *Brucella abortus* produced by engineered *Escherichia coli* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* - 2023. - Vol. 11. - P. 1121074. doi: 10.3389/fbioe.2023.1121074

**232.** Oliveira S.C., Giambartolomei G.H., Cassataro J. Confronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis // *Expert Rev Vaccines.* - 2011. - Vol. 10, Suppl. 9. - P. 1291–1305. doi: 10.1586/erv.11.110

**233.** Singh D., Somani V.K., Aggarwal S. et al. PLGA (85: 15) nanoparticle based delivery of rL7/L12 ribosomal protein in mice protects against *Brucella abortus* 544 infection: a promising alternate to traditional adjuvants // *Mol. Immunol.* - 2015. - Vol. 68, Suppl. 2. - P. 272–279. doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.011

**234.** Abkar M., Lotfi A.S., Amani J. et al. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: influence of nanoparticulation versus traditional immunization // *Vet. Res. Commun.* - 2015. - Vol. 39, Suppl. 4. - P. 217–228. doi: 10.1007/s11259-015-9645-2

**235.** Sadeghi Z., Fasihi-Ramandi M., Bouzari S. Nanoparticle-based vaccines for brucellosis: calcium phosphate nanoparticles-adsorbed antigens induce cross protective response in mice // *Int. J. Nanomedicine.* - 2020. - Vol. 15. - P. 3877–3886. doi: 10.2147/IJN.S249942

**236.** Perkins S.D., Smither S.J., Atkins H.S. Towards a *Brucella* vaccine for humans // *FEMS Microbiol Rev.* - 2010. - Vol. 34, Suppl. 3. - P. 379–394. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x

**237.** Skurnik M., Biedzka-Sarek M., Lubeck P.S. et al. (). Characterization and biological role of the O-polysaccharide gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 // *J. Bacteriol.* - 2007. - Vol. 189. - P. 7244–7253. doi:10.1128/jb.00605-07

- 238.** Huang J., Guo Y., Yu S. et al. One-step preparation of a self-assembled bioconjugate nanovaccine against *Brucella* // *Virulence*. - 2023. - Vol. 14, Suppl. 1, P. 2280377 doi.org/10.1080/21505594.2023.2280377
- 239.** Animal vaccines market size, share & trends analysis by product (Attenuated live, inactivated, subunit, DNA and recombinant), by animal type (poultry, aqua, ruminants, companion), and segment forecasts, 2019-2026. 2019 Available from: <https://www.researchandmarkets.com/research/dzhxq6/global?w=4> (accessed 01.10.2024)
- 240.** Han Y., Liu Q., Yi J. et al. A biologically conjugated polysaccharide vaccine delivered by attenuated *Salmonella Typhimurium* provides protection against challenge of avian pathogenic *Escherichia coli* O1 infection // *Pathog. Dis.* - 2017. - Vol. 75, Suppl. 8. - ftx102
- 241.** Zhao X., Liang S., Dai Q. et al. Regulated delayed attenuation enhances the immunogenicity and protection provided by recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccines expressing serovar *Choleraesuis* O-polysaccharides // *Vaccine*. - 2018. - Vol. 36. - P. 5010–5019.
- 242.** Mauri M., Sannasiddappa T.H., Vohra P. et al. Multivalent poultry vaccine development using protein glycan coupling technology // *Microb. Cell. Fact.* - 2021. - Vol. 20. - P. 193 doi.org/10.1186/s12934-021-01682-4
- 243.** Smith A.A., Corona-Torres R., Hewitt R.E. et al. Modification of avian pathogenic *Escherichia coli*  $\chi$ 7122 lipopolysaccharide increases accessibility to glycoconjugate antigens // *Microb. Cell Fact.* - 2022. - Vol. 21. - P. 181. doi.org/10.1186/s12934-022-01903-4
- 244.** Vohra P., Chintoan-Uta C., Terra V.S. et al. Evaluation of glycosylated FlpA and SodB as subunit vaccines against *Campylobacter jejuni* colonisation in chickens // *Vaccin.* - 2020. - Vol. 8. - P. 520. doi:10.3390/vaccines8030520
- 245.** Corona-Torres R., Vohra P., Chintoan-Uta C. et al. Evaluation of a FlpA glycoconjugate vaccine with ten N-heptasaccharide glycan moieties to reduce *Campylobacter jejuni* colonisation in chickens // *Vaccin.* - 2024. - Vol. 12. - P. 395. doi.org/10.3390/vaccines12040395

- 246.** Ishioka G.Y., Lamont A.G., Thomson D. et al. MHC interaction and T cell recognition of carbohydrates and glycopeptides // *J. Immunol.* - 1992. - Vol. 148. - P. 2446–2451.
- 247.** Avci F.Y., Li X., Tsuji M. et al. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design // *Nat. Med.* - 2011. - Vol. 17. - P. 1602–1609
- 248.** Sun X., Stefanetti G., Berti F. et al. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines // *PNAS.* - 2019. - Vol. 116.- P. 193–198.
- 249.** Middleton D.R., Sun L., Paschall A.V. et al. T cell-mediated humoral immune responses to type 3 capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumonia* // *J. Immunol.* - 2017. - Col. 199. - P. 598–603.
- Adamo R., Nilo A., Castagner B. et al. Synthetically defined glycoprotein vaccines: current status and future directions // *Chem. Sci.* - 2013. – - Vol. 4. - P. 2995–3008.

## Разработка вакцин против хеликобактерной инфекции

Инфицирование *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является серьезной проблемой во всем мире, поскольку является причиной хронического гастрита, язвы и рака желудка. Уровень инфицированности *H. pylori* в мире составляет около 50%, причем в развивающихся странах этот показатель выше, чем в развитых. Комбинация антибиотиков может избавить от *H. pylori*-инфицирования, но часто случается рецидив и развивается лекарственная устойчивость к этому патогену. Одной из перспективных стратегий профилактики и терапии *H. pylori* является создание вакцины, успешное внедрение которой в медицинскую практику поможет кардинальным образом изменить подход к ведению пациентов с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями. Понимание иммунных реакций против *H. pylori* имеет решающее значение для разработки эффективных и безопасных вакцин.

В качестве антигенов для иммунизации против *H. pylori* предлагался ряд белковых факторов, вовлеченных в патогенетические механизмы развития хеликобактериоза: VacA, CagA, NapA, BabA, SabA и уреазы [1]. Использование вакцин на основе этих белков явилось эффективным в профилактике экспериментального инфицирования у животных [2]. Использование очищенных антигенов микроба успешно индуцирует защитные механизмы для борьбы с инфекцией, что продемонстрировано в исследованиях на животных (профилактических и терапевтических протоколах) [3]. Ассоциация двух или трех антигенов может вызвать более сильный иммунный ответ, чем использование одного антигена.

Уреазы является наиболее перспективным кандидатом, и ее ценность в качестве вакцинного антигена была подтверждена многочисленными исследованиями на модели животные/человек [Таблица 4].

Таблица 4. Рекомбинантные вакцины на основе фермента уреазы

| Вакцинные компоненты                  | Способы введения | Продуцент рекомбинантного белка        | Защитные реакции         | Животные/Человек             | Источники литературы |
|---------------------------------------|------------------|--|--------------------------|------------------------------|----------------------|
| <b>Urease, LT</b>                     | Перорально       | <i>E. coli</i>                         | IgG, IgA                 | Человек                      | [4]                  |
| <b>Urease</b>                         | Назально         | <i>S. typhimurium phoP<sup>c</sup></i> | IgG, IgA, Th1, Th2       | Мыши линии BALB/c            | [5]                  |
| <b>Urease subunit B</b>               | Перорально       | <i>L. lactis</i> MG1363                | IgG, IgA                 | Мыши линии C57BL/6           | [6]                  |
| <b>CFAdE (Urease-Lpp20-HpaA-CagL)</b> | Перорально       | <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)     | IgG, IgA                 | Мыши линии BALB/c            | [7]                  |
| <b>CotC-CTB-UreB</b>                  | Перорально       | <i>B. subtilis</i> WB6                 | IgG, IgA, Th1, Th2       | Мыши линии BALB/c e          | [8]                  |
| <b>CWAE (Urease-HpaA-Hsp60-NAP)</b>   | Перорально       | <i>E. coli</i> BL21                    | IgG, IgA, Th1, Th17      | Мыши линии BALB/c            | [9]                  |
| <b>Ruh (UreB-HpaA)</b>                | Перорально       | <i>E. coli</i> BL21                    | IgG                      | Новозеландские белые кролики | [10]                 |
| <b>CTB-UreI-UreB</b>                  | Перорально       | <i>E. coli</i> BL21                    | IgG, IgA, Th1, Th2, Th17 | Мыши линии BALB/c            | [11]                 |
| <b>HUepi-LTB</b>                      | Перорально       | <i>E. coli</i> BL21                    | IgG, IgA, Th1, Th2       | Мыши линии BALB/c            | [12]                 |
| <b>NAP, UreA,UreB, dmLT</b>           | Перорально       | <i>E. coli</i> BL21                    | IgG, IgA, Th1, Th17      | Мыши линии BALB/c            | [13]                 |
| <b>Urease and HP0231</b>              | Перорально       | <i>S. enterica</i> Typhi Ty21a         | Th1                      | Человек                      | [14]                 |
| <b>UreB-IL-2 DNA vaccine</b>          | Перорально       | <i>S. typhimurium</i> SL7207           | Effective protection     | Мыши линии C57BL/6           | [15]                 |
| <b>UreB DNA vaccine</b>               | Перорально       | Poliovirus                             | IgG, Th1                 | Мыши линии C57BL/6           | [16]                 |
| <b>CTB-UA</b>                         | Перорально       | <i>E. coli</i> BL21                    | IgG, IgA, Th1, Th2, Th17 | Мыши линии C57BL/6           | [17]                 |

|   |            |   |  |                    |      |
|---|------------|---|--|--------------------|------|
| <b>CtUBE</b>  | Перорально | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA, Th1, Th2, Th17                             | Мыши линии BALB/c  | [18] |
| <b>FVpE</b> (CagA302–437, VacA1–46 и VacA332–494, UE) | Подкожно   | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA, Th1, Th2, Th17                             | Мыши линии BALB/c  | [19] |
| <b>HSBP-CTB</b>                                       | Перорально | Synthesized   | IgG, IgA   | Мыши линии BALB/c  | [20] |
| <b>HspA-HpaA-UreB414</b>                              | Перорально | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA, Th1, Th2                                   | Мыши линии BALB/c  | [21] |
| <b>UreB138</b>  | Подкожно   | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA   | Мыши линии C57BL/6 | [22] |
| <b>CTB-UE-CF (CCF)</b>                                | Перорально | <i>E. coli</i>  | IgG, IgA   | Мыши линии BALB/c  | [23] |
| <b>HP55/PLGA-CCF</b>                                  | Перорально | <i>E. coli</i>  | IgG, IgA, Th1, Th17                                  | Мыши линии BALB/c  | [24] |
| <b>HP55/PBCA-CCF</b>                                  | Перорально | <i>E. coli</i>  | IgG, IgA, Th1, Th17                                  | Мыши линии BALB/c  | [25] |
| <b>CUE-GEM</b>  | Перорально | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA   | Мыши линии BALB/c  | [26] |
| <b>CTB-HUUC</b>                                       | Перорально | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA, Th1, Th2, Th17                             | Мыши линии BALB/c  | [27] |
| <b>rFlid</b>  | Перорально | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA   | Мыши линии C57BL/6 | [28] |
| <b>rFUVL (Flid-UreB-VacA-CagL)</b>                    | Перорально | <i>E. coli</i> BL21                                   | IgG, IgA, Th1, Th2, Th17                             | Мыши линии C57BL/6 | [29] |
| <b>EBY100/pYD1-UreB,</b>                              | Перорально | <i>S. cerevisiae</i> EBY100                           | Гуморальный иммунитет и иммунитет слизистых оболочек | Мыши линии BALB/c  | [30] |
| <b>EGDeAB-MECU</b> (Multi-epitope chimeric UreB).     | Перорально | <i>Listeria monocytogenes</i> EGDeΔactA/inlB (EGDeAB) | IgA и IgG Th1, Th2, Th17                             | Мыши линии BALB/c  | [31] |

В качестве антигенов при создании вакцины против *H. pylori* рассматривают CagA и VacA, которые играют важную роль в патогенезе тяжелых форм *H. pylori*-ассоциированных заболеваний (язвенная болезнь и рак желудка). Ряд рекомбинантных вакцин на основе этих белков приведены в [Таблица 5].

**Таблица 5. Рекомбинантные вакцины на основе CagA и VacA**

| Вакцинные компоненты        | Способы введения          | Продуцент рекомбинантного белка | Защитные реакции                                     | Животные/Человек  | Источники литературы |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|--|-------------------|----------------------|
| <b>CagA-VacA-UreB</b>       | Перорально                | <i>S. typhimurium</i> X4550     | IgG, IgA, Th1  | Мыши линии BALB/c | [32]                 |
| <b>HP3(VacA, CagA, NAP)</b> | Внутримышечно             | <i>E. coli</i>                  | IgG, Th1   | Человек           | [33]                 |
| <b>Brucella OMPs-CagA</b>   | Подкожно                  | <i>E. coli</i> BL21             | IgG, Th1   | Мыши линии BALB/c | [34]                 |
| <b>EBY100/pYD1-VacA</b>     | Перорально                | <i>S. cerevisiae</i> EBY100     | Гуморальный иммунитет и иммунитет слизистых оболочек | Мыши линии BALB/c | [30]                 |
| <b>rCagA, CpG</b>           | Перорально, внутримышечно | <i>E. coli</i> BL21             | IgG, Th1   | Мыши линии BALB/c | [35]                 |

Необходимо отметить, что при создании вакцины против *H. pylori*, исследователи не ограничились лишь вышеупомянутыми вакцинными антигенами и продолжают их поиск. Некоторые разработки рекомбинантных вакцин на основе других компонентов *H. pylori* представлены в Таблице 6.

**Таблица 6. Рекомбинантные вакцины на основе различных компонентов *H. pylori***

| Вакцинные компоненты | Способы введения | Продуцент рекомбинантного белка        | Защитные реакции                | Животные/Человек             | Источники литературы |
|----------------------|------------------|--|---------------------------------|------------------------------|----------------------|
| <b>Omp22-НраА</b>    | Перорально       | <i>L. lactis</i> NZ3900                | IgG, IgA                        | Мыши линии BALB/c            | [36]                 |
| <b>CagL</b>          | Подкожно         | <i>E. coli</i> BL21                    | Снижение бактериальной нагрузки | Новозеландские белые кролики | [37]                 |
| <b>НраА</b>          | Перорально       | Non-virulent <i>Vibrio cholerae</i> O1 | IgG                             | Мыши линии C57BL/6           | [38]                 |

|   |             |                                 |  |                    |      |
|---|-------------|---------------------------------|--|--------------------|------|
| <b>CTB-Lpp20</b>                                  | Перорально  | <i>E. coli</i> BL21             | IgG, IgA, Th1                              | Мыши линии BALB/c  | [39] |
| <b>HpaA</b>                                       | Перорально  | <i>L. lactis</i>                | IgG, IgA                                   | Мыши линии BALB/c  | [40] |
| <b>AhpC</b>                                       | Перорально  | <i>E. coli</i> BL21             | IgG, Th1                                   | Мыши линии C57BL/6 | [41] |
| <b>rOmp18</b>                                     | Перорально  | <i>E. coli</i> BL21             | IgG, Th1, Th2                              | Мыши линии C57BL/6 | [42] |
| <b>HspA-Omp18</b>                                 | Внутрикожно | <i>E. coli</i> BL21             | IgG  | Мыши линии BALB/c  | [43] |
| <b>Hsp60</b>                                      | Перорально  | <i>E. coli</i> POP2136          | IgG  | Мыши линии C57BL/6 | [44] |
| <b>OipA DNA vaccine</b>                           | Перорально  | <i>S. typhimurium</i> SL7207    | IgG, Th1, Th2                              | Мыши линии C57BL/6 | [45] |
| <b>OipA DNA vaccine</b>                           | Перорально  | <i>S. typhimurium</i> SL7207-BG | IgG, Th1, Th2                              | Мыши линии C57BL/6 | [46] |
| <b>Omp26</b>                                      | Перорально  | <i>M. smegmatis</i> MC2155      | IgG1, IgA, Th1, Th2                        | Мыши линии BALB/c  | [47] |
| <b>Hp0410</b>                                     | Перорально  | <i>L. acidophilus</i>           | IgG, IgA                                   | Мыши линии C57BL/6 | [48] |
| <b>NapA DNA vaccine</b>                           | Перорально  | <i>S. typhimurium</i> SL7207    | IgG, IgA                                   | Мыши линии C57BL/6 | [49] |
| <b>FlaA and FlaB</b>                              | Non         | <i>E. coli</i> BL21             | IgG  | Человек            | [50] |
| <b>GST-Cag12</b>                                  | Перорально  | <i>L. lactis</i>                | Гуморальный иммунитет                      | Мыши линии C57BL/6 | [51] |
| <b>Lpp20-IL-2 DNA vaccine</b>                     | Перорально  | Hella cells                     | Гуморальный и клеточный иммунитет          | Мыши линии C57BL/6 | [52] |
| <b>Bacterioferritin</b>                           | Подкожно    | <i>E. coli</i> BL21             | Оксид азота (NO), Th1                      | Мыши линии BALB/c  | [53] |
| <b>MVTLINNE (Met-Val-Thr-Leu-Ile-Asn-Asn-Glu)</b> | Подкожно    | -                               | IgM, IgA, IgG1 и IgG2a,                    | Мыши линии BALB/c  | [54] |
| <b>OMVs-CT</b>                                    | Перорально  | -                               | Гуморальный и иммунитет слизистых оболочек | Мыши линии C57BL/6 | [55] |
| <b>pcDNA3.1 (+)-cagW-CS-NPs</b>                   |             | <i>E. coli</i> TOP10F'          | Гуморальный и иммунитет слизистых оболочек | Мыши линии BALB/c  | [56] |
| <b>L. lactis-pAMJ2008-CagL</b>                    | Перорально  | <i>L. lactis</i> MG1363         | IgG, IgA, Th1, Th17                        | Мыши линии BALB/c  | [57] |

Y. Zhong с соавторами (2020) исследовали влияние пероральной иммунизации рекомбинантными белковыми антигенами *H. pylori* (NAP/UreA/UreB) в присутствии двойного мутантного термолабильного токсина (dmLT), в качестве нетоксичного адъюванта у мышей BALB/c [13]. Для получения рекомбинантных белков гены NAP/UreA/UreB из *H. pylori* 26695 были экспрессированы в *E. coli* BL21 (DE3). Был получен рекомбинантный белок dmLT, который для использования был разведен в дистиллированной воде до 1 мг/мл и хранился при температуре -70°C. Мыши были разделены на 4 группы по девять особей в каждой для получения четырех доз (на 0, 7, 14 и 28 день) перорального вакцинного препарата. Первая группа мышей получала физраствор, вторая – по 10 мкг каждого антигена-кандидата NAP/UreA/UreB и 10 мкг dmLT, третья – по 100 мкг каждого антигена-кандидата NAP/UreA/UreB и 10 мкг dmLT, четвертая – по 300 мкг антигенов лизата *H. pylori* SS1 и 10 мкг dmLT. Через восемь дней после окончательной иммунизации всем группам перорально вводили 200 мкл *H. pylori* SS1 ( $5 \times 10^7$  КОЕ). Авторы продемонстрировали, что пероральная иммунизация рекомбинантными антигенами *H. pylori* NAP/UreA/UreB и dmLT обеспечивает более эффективную профилактическую защиту от инфекции *H. pylori*, чем вакцина на основе бактериального лизата у мышей BALB/c. У иммунизированных мышей наблюдалась усиленная пролиферация антигенспецифических лимфоцитов, а также реакция на IgG в сыворотке крови и IgA в слизистой оболочке. Кроме того, иммунизация увеличила долю CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> лимфоцитов в селезенке и брыжеечных лимфатических узлах и усилила выработку IL-17, IL-16, IL-6 и TNF- $\alpha$  в супернатантах культуры лимфоцитов.

Sen Q. с коллегами (2020) разработали две пероральные вакцины против *H. pylori* на основе *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*): EBY100/pYD1-UreB и EBY100/pYD1-VacA. Для получения EBY100/pYD1-UreB ген UreB (1710 п.н.) был амплифицирован методом ПЦР из *H. pylori* SS1, а затем клонирован в экспрессирующую плазмиду pYD1. Полученная плаزمид

pYD1-UreB была трансформирована в компетентные клетки *E. coli* DH5a, а затем электропорирована в компетентные клетки *S. cerevisiae* EBY100. Далее клетки культивировали в твердой среде, селективной по Trp, содержащей 0,67% азотистой основы дрожжей без аминокислот (YNB), 2% глюкозы, 0,01% лейцина, 2% агара и 1 М сорбита. Положительные клоны EBY100/pYD1-UreB были подтверждены методом ПЦР-детекции. Аналогичным образом был также сконструирован EBY100/pYD1-VacA. В качестве отрицательного контроля использовали EBY100/pYD1. Пероральную иммунизацию проводили на мышинной модели (использовались 6-недельные самки BALB/c) один раз в неделю в течение шести недель. Образцы крови и кала были взяты у всех вакцинированных мышей на 14, 28 и 42-й дни после первичной иммунизации, в которых с помощью ИФА были измерены уровни специфичных к UreB или VacA IgG-антител, а также секреторных IgA-антител. Авторы получили результаты, согласно которым, пероральная иммунизация EBY100/pYD1-UreB и EBY100/pYD1-VacA вызывала значительные гуморальные иммунные реакции и реакции слизистой оболочки. Уровни IgG-антитела против UreB или VacA в крови иммунизированных мышей постепенно повышались на 14, 28 и 44 день в сравнении с контрольной группой мышей, где повышения уровня данных антител не наблюдалось. Содержание секреторных IgA-антител против UreB или VacA у вакцинированных EBY100/pYD1-UreB, EBY100/pYD1-VacA было статистически значимо выше в сравнении с группой мышей, которые получали EBY100/pYD1. В то же время авторы продемонстрировали, что пероральные вакцины (EBY100/pYD1-UreB, EBY100/pYD1-VacA) на основе *S. cerevisiae* эффективно снижали бактериальную нагрузку у мышей, инфицированных штаммом *H. pylori* SS1[30].

Wang, S с коллегами (2021) разработали пероральную вакцину (EGDeAB-MECU) против *H. pylori*. Авторы использовали аттенуированный штамм *Listeria monocytogenes* EGDe $\Delta$ actA/inlB (EGDeAB) в качестве вектора для экспрессии мультиэпитопного химерного вакцинного антигена MECU

(Multi-epitope chimeric UreB). Поскольку ранее было продемонстрировано, что белки UreB, FlaA, AlpB, SabA и HpaA *H. pylori* могут использоваться в качестве потенциальных вакцинных антигенов, авторы разработали конструкцию (MECU) на основе рекомбинантного химерного белка, содержащего структурный каркас из UreB, где пять пептидных последовательностей в UreB были заменены эпитопами HpaA, AlpB, SabA и FlaA, принадлежащих штамму *H. pylori* SS1, с линкерами 'KK', 'GS' и 'GGS'. Оптимизированная последовательность ДНК MECU была синтезирована компанией Sangon Biotech (Шанхай, Китай) и амплифицирована методом ПЦР с использованием праймеров MECU-F/R. Промотор Plmo0248 и сигнальный пептид белка P60 (SP60) были клонированы из генома EGDe с использованием праймеров Plmo0248-F/R и SP60-F/R. Plmo0248 был необходим для оптимизации транскрипции и экспрессии чужеродных белков в кислой среде желудка, а сигнальный пептид белка P60 для индуцирования высвобождения чужеродного белка MECU. Далее последовательности MECU, Plmo0248 и SP60 были клонированы в плазмиду pERL3. Рекомбинантная плазида pERL3-Plmo0248-SP60-MECU была трансформирована с помощью электропорации в *L. monocytogenes* (EGDeAB) для получения вакцинного штамма (EGDeAB-MECU), который, как показали результаты исследования, экспрессировал мультиэпитопный химерный антиген MECU. Авторы продемонстрировали, что иммунизация мышей BALB/c MECU индуцировала высокие уровни антител, специфичных к антигенам *H. pylori* (UreB, FlaA, AlpB, SabA и HpaA). Кроме того, терапевтическая иммунизация с помощью MECU значительно снижала колонизацию *H. pylori* в желудке у мышей, инфицированных данным микроорганизмом. Эти данные свидетельствуют о том, что аттенуированный штамм *L. monocytogenes* EGDeAB, используемый в качестве перспективного вакцинного вектора против *H. pylori*, имеет большие перспективы в профилактике и лечении инфекции *H. pylori* в будущем [31].

Peng, X с коллегами (2018) разработали пероральную кандидатную вакцину против *H. pylori*. Авторы использовали штамм *Lactococcus lactis* в качестве вектора для экспрессии NapA. Для получения штамма *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110-napA-LysM), ген NapA был амплифицирован методом ПЦР из *H. pylori* MEL-Hp27, а затем клонирован в экспрессирующую плазмиду pNZ8110-LysM. Полученная рекомбинантная плазида (pNZ8110-napA-LysM) была электропорирована в компетентные клетки *L. lactis* NZ3900. Продукты экспрессии были идентифицированы с помощью электрофореза и вестерн-блоттинга с использованием мышинной антисыворотки против *H. pylori*. Экспрессируемый NapA составлял 15% белков лизата клеток *L. lactis* NZ3900, демонстрируя высокую эффективность экспрессии. Пероральную иммунизацию проводили на мышинной модели (использовались 6-недельные самцы и самки BALB/c) на 0, 7, 14, 21, 28 и 35 сутки. Первая группа мышей (n=22) получала клеточную суспензию дозой 250 мкл ( $5 \times 10^{10}$  КОЕ/мл) *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110-napA-LysM), вторая группа мышей (n=22) получала ту же дозу клеточной суспензии *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110), третья группа мышей (n=22) получала равные объемы PBS. Мыши из четвертой группы (n=10) не получали никаких суспензий и выступали в качестве контроля. Через семь дней после последней вакцинации у половины мышей из каждой группы были взяты образцы крови и фекалий, а оставшихся мышей использовали в эксперименте по заражению штаммом *H. pylori* 11637. Мышам всех трех групп вводили через зонд по 200 мкл суспензии *H. pylori* 11637 ( $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл) на 7, 10, 13 и 16-й день после иммунизации. Группа мышей, которая получала PBS, была использована в качестве положительного контроля. Результаты исследования продемонстрировали, что пероральная вакцинация *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110-napA-LysM) вызывала заметное повышение системного гуморального иммунитета и иммунитета слизистых оболочек. Образцы сыворотки крови и кала были протестированы методом иммуноферментного анализа на NapA-специфические антитела. Было показано, что уровни как sIgA в кале, так и IgG в сыворотке крови были выше в группе мышей,

получающих *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110-narA-LysM) в сравнении с группами, получающие *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110) и PBS. В то же время было показано, что пероральная вакцинация *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110-narA-LysM) значительно снижала бактериальную нагрузку в желудках мышей, инфицированных *H. pylori*, но не смогла защитить мышей от инфекции. В желудках мышей, иммунизированных *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110-narA-LysM), количество *H. pylori* было значительно ниже, чем в группе мышей, получавших *L. lactis* NZ3900 (pNZ8110) или PBS, но выше в сравнении с контрольной группой мышей. Таким образом, использование штамма *L. lactis* в качестве вектора для экспрессии NarA может быть эффективным средством для пероральной вакцинации для создания защитного иммунитета против *H. pylori* [58].

Ran, X. с коллегами (2018) разработали пероральную поливалентную эпитопную вакцину (СТВ)-HUUC, которая содержала адъювант СТВ (Cholera Toxin B subunit), а также девять Т-клеточных эпитопов (HpaA88-100, UreA27-53, UreB229-251, UreB317-329, UreB373-385, UreB438-452, UreB546-561, CagA149-164, and CagA196-217) и три В-клеточных эпитопа (HpaA132-141, UreA183-203, and UreB321-339) из антигенов *H. pylori* (HpaA, UreA, UreB, CagA). Для объединения эпитопов были использованы линкеры KK и GS. Последовательность адъюванта СТВ была добавлена к N-концу HUUC. Последовательность гена, кодирующая (СТВ)-HUUC, была синтезирована и клонирована в вектор pET28a. pET28a-(СТВ)-HUUC была внесена в компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3), где экспрессию белков индуцировали с помощью IPTG. Белки очищали с помощью хроматографии на колонке с Ni<sup>2+</sup>-сефарозой. После очистки образцы подвергали диализу с использованием 0,2 М гидрокарбонатно-натриевого буфера. Чистоту СТВ-HUUC оценивали с помощью 12%-ного SDS-PAGE и она составила 97,6%. Эффективность (СТВ)-HUUC была оценена на мышинной модели BALB/c. Результаты показали, что пероральная иммунизация СТВ-HUUC значительно повышала уровни специфических сывороточных IgG и секреторного sIgA

слизистой оболочки желудка и кишечника по сравнению с группой мышей, которые получали PBS. Авторы также исследовали специфичность сыворотки мышей, иммунизированных СТВ-HUUC, с использованием очищенных пептидов СТВ, HpaA, UreA, UreB, and CagA. Было показано, что сыворотка мышей, иммунизированных СТВ-HUUC, распознает пептиды (СТВ, HpaA, UreA, UreB, and CagA), сыворотка мышей, иммунизированных СТВ, распознает только СТВ, а сыворотка мышей, иммунизированных PBS, не распознает ни один из белков. Эти результаты показали, что СТВ, HpaA, UreA, UreB, CagA, входящие в СТВ-HUUC обладают хорошей иммуногенностью и иммунореактивностью. В то же время было продемонстрировано, что сыворотка, иммунизированных СТВ-HUUC мышей, но не мышей, иммунизированных СТВ или PBS, ингибировала активность уреазы *H. pylori*. Вакцинация СТВ-HUUC способствовала развитию специфических для *H. pylori* реакций лимфоцитов и продукции IFN- $\gamma$ , IL - 4 и IL - 17. В свою очередь профилактические и терапевтические эффекты пероральной вакцинации СТВ-HUUC значительно снижали бактериальную нагрузку в желудках мышей BABL/c, инфицированных *H. pylori* SS1 [27].

Xie, W. с коллегами (2021) разработали похожую пероральную поливалентную эпитопную вакцину под названием LHUC, которая содержала адъювант LTВ (heat-labile enterotoxin B subunit), а также три Т-клеточных эпитопа (HpaA154-171, UreB237-251 и UreB546-561) и пять В-клеточных эпитопов (UreB349-363, UreB327-334, CAT349-405, CAT387-397 и HpaA132-141) из антигенов *H. pylori* (UreB, HpaA и CAT). Для соединения последовательностей эпитопов были использованы линкеры KK и GS. Последовательность, кодирующая LHUC, была оптимизирована для экспрессии в *E. coli*. Сайты ферментов рестрикции Nde I и Hind III были добавлены с обеих сторон последовательности гена. Последовательность была синтезирована и клонирована в вектор pET28a. К N-концу гена LHUC была добавлена 6-His последовательность. pET28a-LHUC была трансформирована в компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) с последующей индукцией

экспрессии белков с помощью IPTG. Бактерии подвергали лизису с помощью ультразвука, а лизаты промывали 0,5% раствором Triton-X100. После промывки тельца включения растворяли в 8 М растворе мочевины, а затем очищали с помощью хроматографии на колонке с Ni<sup>2+</sup>-сефарозой. Конечный очищенный продукт разделяли на 12% SDS-PAGE. Электрофорез показал, что молекулярная масса продукта составляет приблизительно 27 кД. Результаты вестерн-блоттинга продемонстрировали, что синтезированный пептид LHUC может быть распознан кроличьими поликлональными антителами против *H. pylori* и кроличьими моноклональными антителами против 6-His. Профилактический и терапевтический эффекты LHUC оценивали на мышах C57BL/6. При оценке профилактического эффекта LHUC мыши были разделены на три группы по 6 мышей в каждой группе, которые перорально получали четыре дозы препарата с интервалом 1 раз в неделю. Первая группа получала 100 мкг LHUC, вторая - 100 мкг LTB, а третья (контрольная) - 100 мкг PBS. После иммунизации мышей заражали *H. pylori*. При оценке терапевтического эффекта LHUC мыши были также разделены на три группы по 6 мышей в каждой группе, которых изначально заражали *H. pylori*, а затем вводили препараты (LHUC, LTB и PBS). Было показано, что профилактические и терапевтические эффекты пероральной вакцинации LHUC значительно снижали бактериальную колонизацию. В то же время было обнаружено, что в сыворотке крови мышей BALB/c, иммунизированных подкожно LHUC, обнаруживаются антитела класса IgG против LHUC, rLTB, rHpaA, rUreB, rCAT и их уровни были значительно выше, чем в группах мышей, которые получали LTB и PBS. В слизистой оболочке желудка и кишечнике мышей BALB/c также были выявлены sIgA, распознающие LHUC, их уровни были повышены в сравнении с мышами, получавшими LTB и PBS. Кроме того, было продемонстрировано, что синтезированный пептид LHUC активирует Th1, Th2 и Th17 реакции у мышей. Секреция лимфоцитами мышей (иммунизированных LHUC) IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 была значительно увеличена по сравнению с секрецией лимфоцитами мышей, иммунизированных LTB и PBS.

Таким образом, LHUC является многообещающей и безопасной вакциной, которая может эффективно снижать колонизацию *H. pylori* в желудке [59].

Espinosa-Ramos, D с коллегами (2019) разработали вакцину на основе синтетического пептида с последовательностью Met-Val-Thr-Leu-Ile-Asn-Asn-Glu (MVTLINNE), который является частью белка, идентифицированного, как гомолог цитратсинтазы, и ранее был описан и запатентован в качестве диагностического средства при *H. pylori*-инфекции. MVTLINNE был синтезирован компанией Genscript (Нанкин, Китай) с чистотой >85% в двух модификациях с ацетилированием на аминоконце и амидированием на карбоксильном конце. Данный препарат хранился в лиофилизированном виде, а перед применением разводился в физиологическом растворе. Исследование синтетического пептида MVTLINNE проводили на мышах линии BALB/c. При оценке профилактического эффекта синтетического пептида MVTLINNE мышей иммунизировали подкожно, а затем заражали клетками штамма *H. pylori* ATCC 700824 путем его добавления ( $10^9$  КОЕ/л) в питьевую воду. При оценке терапевтического эффекта MVTLINNE мышей изначально заражали *H. pylori* ATCC 700824, а затем иммунизировали синтетическим пептидом. Было показано, что профилактическая иммунизация значительно снижала количество колонизирующих бактерий, поскольку продукция IgA, опосредованная вакцинацией, коррелировала с отсутствием изменений в слизистой оболочке желудка и редким присутствием бактерий после инфицирования *H. pylori* в сравнении с контрольной группой мышей, инфицированных *H. pylori*, но не получавших вакцину. В то же время было обнаружено, что иммунизация пептидом MVTLINNE стимулировала клеточный иммунный ответ, о чем свидетельствует увеличение размера селезенки иммунизированных мышей и усиление пролиферативного ответа лимфоцитов тимуса, опосредованного *H. pylori*. Напротив, инфекция значительно снижала лимфопролиферацию, которая восстанавливалась у иммунизированных мышей. Однако уровни сывороточных IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  статистически значимо не различались между

иммунизированными и не иммунизированными животными, за исключением П-6, который значительно повышался в сравнении с контрольной группой животных. Изотип антител в контрольной группе (мыши, инфицированные *H. pylori*, но не получавшие вакцину) был представлен антителами класса IgM, тогда как у мышей, иммунизированных вакциной, выявлялись антитела IgM, IgA, IgG1 и IgG2a, а у мышей, иммунизированных и инфицированных микробом, обнаруживались IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3. Таким образом, иммунизация пептидом MVTLINNE защищает мышей от инфекции и заслуживает дальнейших исследований в качестве подхода к профилактике инфекции *H. pylori* [54].

Везикулы внешней мембраны (OMV), продуцируемые грамотрицательными бактериями, попали в поле зрения исследователей как идеальный источник вакцин и адъювантных компонентов [39, 60]. OMV содержат различные биологически активные компоненты, которые участвуют в различных биологических процессах [61]. Доказано, что OMV в виде вакцин на основе наночастиц стимулируют иммунитет слизистой оболочки и защитную активность многих кишечных бактерий [62,63].

Liu, Q с коллегами (2019) исследовали белковый состав и потенциальную вакцинную функцию везикул внешней мембраны, выделенных методом ультрацентрифугирования из адаптированного к песчанке штамма *H. pylori* 7.13. Для изучения белковых компонентов OMV, полученных из *H. pylori*, была использована стратегия однократного определения содержания белка с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим анализом (LC-MS/MS-спектрометрия), и было идентифицировано в общей сложности 169 белков.

Мыши линии C57BL/6 по 18 особей в каждой из трех групп были иммунизированы перорально OMVs в присутствии или отсутствии cholera toxin (CT) в качестве адъюванта (мыши получали либо 200 мкг OMVs, либо 100 мкг OMVs + 20 мкг CT, либо 200 мкг OMVs 20 мкг + CT соответственно). В то же время две другие группы мышей C57BL/6 по 18 особей в каждой

получали штамм *H. pylori* 7.13, состоящий из  $10^9$  инактивированных клеток в присутствии или отсутствии адьюванта (СТ). Мыши, которые получали 20 мкг СТ или 200 мкл PBS служили отрицательным контролем. Повторную иммунизацию проводили через 4 недели после первой иммунизации. Через пять недель после повторной иммунизации 9 из 18 мышей от каждой группы были использованы для получения образцов тканей желудка с целью определения уровней провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- $\alpha$ ). Также были выделены спленциты для оценки поляризующих эффектов иммунизации на Th1/Th2 путем измерения уровней IL-10, IL-4, IL-13 и IL-12 (p40). Остальные мыши по 9 из каждой группы были использованы для экспериментов, в ходе которых этим мышам перорально вводили  $10^8$  КОЕ *H. pylori* SS1. Полученные данные продемонстрировали, что пероральная иммунизация OMVs может вызывать сильный гуморальный и значительно более высокий иммунный ответ со стороны слизистых оболочек, чем в группе, иммунизированной инактивированным штаммом *H. pylori* 7.13 в присутствии холерного токсина. Более того, авторы показали, что OMV преимущественно индуцировали Th2 иммунные реакции, которые способствовали снижению бактериальной нагрузки после заражения штаммом *H. pylori* SS1. Таким образом, OMV перспективны для разработки вакцин для профилактики *H. pylori*-инфекции [55].

Chehelgerdi и соавт. (2020) разработали ДНК-вакцину против *H. pylori*-инфекции на основе *cagW*, инкапсулированной в наночастицы хитозана (pcDNA3.1 (+)-*cagW*-CS-NPs), которую исследовали на мышях линии BALB/c. Одно из преимуществ применения наночастиц связано с доставкой вакцин, поскольку они зарекомендовали себя, благодаря их потенциалу в доставке специфических лекарственных средств, комбинированной терапии, низкой токсичности, низкой дозировке препаратов с минимумом побочных эффектов. Плохая доставка вакцины и ее инактивация из-за деградации ДНК-азой приводят к снижению иммуногенности ДНК-вакцин, следовательно, наночастицы могут повысить эффективность доставки ДНК-вакцины и

защитить ее от деградации. Более того, было подтверждено, что инкапсуляция хитозаном защищает ДНК-плазмиду от расщепления ДНКазой I, а иммунофлуоресцентный анализ показал, что ген *cagW* может экспрессироваться в клетках HDF и в то же время сохранять хорошую биологическую активность.

Бактериальная ДНК была выделена из штамма *H. pylori* ATCC: 43504. ПЦР-амплификацию осуществляли с использованием специфических праймеров для гена *cagW*, которые были разработаны компанией Beacon Designer. Амплифицированные фрагменты *cagW* были очищены с помощью набора для экстракции гелем Qiagen (Qiagen, Германия) и лигированы в плазмидный вектор pсDNA3.1 (+) с использованием набора для ПЦР-клонирования Thermo Fisher Scientific в соответствии с протоколом производителя. pсDNA3.1 (+)-*cagW* трансформировали в компетентные клетки *E. coli* TOP10F' химическим методом с использованием хлорида кальция (CaCl<sub>2</sub>). Наличие ДНК-вставки *cagW* определяли путем скрининга бактериальных колоний с помощью ПЦР. Рекомбинантный вектор был очищен с использованием набора для мини-экстракции плазмид (Bioneer, Корея) и проанализирован с помощью специфических праймеров *cagW*. Чтобы подтвердить точность клонирования, рекомбинантный вектор был обработан ферментами рестрикции BamHI и EcoRV для подтверждения присутствия фрагмента *cagW*. Хитозан (с молекулярной массой 71,3 кДа и степенью деацетилирования 80%) был получен компанией Sigma-Aldrich (Сигма, Сент-Луис, Миссури, США). Для получения наночастиц хитозана с плазмидной ДНК pсDNA3.1 (+)-*cagW* был применен комплексный метод коацервации. Сначала растворы хитозана и плазмидной ДНК помещали на водяную баню с температурой 55°C на 30 минут. Затем смесь раствора плазмидной ДНК и хитозана перемешивали в течение 30 с. После центрифугирования при 2500 об/мин в течение 10 мин при 4°C наночастицы плазмидной ДНК хитозана извлекали из осадка и растворяли в физиологическом растворе с фосфатным

буфером (PBS, pH 7,4). Конечные наночастицы были названы pcDNA3.1 (+)-cagW-CS-NPS.

Мышам в мышцы вводили либо PBS-контроль, либо плазмиду pcDNA3.1 (+), pcDNA3.1 (+)-cagW, либо pcDNA3.1 (+)-cagW-CS-NPS. Титры сывороточных антител классов IgG и IgM определяли иммуноферментным методом. Продемонстрировано, что после вакцинации указанными плазмидами на 45-й день происходила выработка сывороточных антител класса IgG. Вакцина, основанная на pcDNA3.1 (+)-cagW-CS-NPs, индуцировала более высокий гуморальный иммунный ответ, чем pcDNA3.1 (+)-cagW и pcDNA3.1 (+), а титры антител класса IgG в сыворотке крови были выше, чем у антител класса IgM, что позволяет предположить, что эти плазмиды вызывают иммунный ответ Th1-типа. Это исследование показало, что наночастицы, построенные из хитозана и ДНК являются эффективными кандидатами для иммунизации против инфекции *H. pylori*, и открывает путь для дальнейших разработок новых вакцин, инкапсулированных в наночастицы хитозана [56].

Большинство разработанных антихеликобактерных вакцин прошли или проходят испытания только на животных, однако уже существует опыт применения вакцин против *H. pylori* у людей. Среди этих вакцин, лишь немногие показали удовлетворительные результаты. В 1996 году было проведено клиническое испытание рекомбинантной уреазной вакцины (rUre), которую вводили перорально без адьюванта добровольцам (n=12) с бессимптомным носительством *H. pylori*-инфекции. Обнаружено, что данный вакцинный препарат безопасен для человека, поскольку хорошо переносится добровольцами, но в то же время не позволяет устранить инфекцию [64].

Очищенные рекомбинантные белки являются слабыми иммуногенами и требуют применения сильных адьювантов. Некоторые бактериальные токсины, в частности термолабильный энтеротоксин *Escherichia coli* (LT), рассматривают в качестве адьюванта для мукозальных вакцин. Он был использован в качестве адьюванта в составе пероральной вакцины,

содержащий рекомбинантную уреазу (в дозах 20, 60, 180 мг) и термолабильный энтеротоксин *Escherichia coli* (LT) в дозе 5 мкг. Данная вакцина была протестирована на добровольцах с бессимптомным носительством *H. pylori*-инфекции. Все добровольцы еженедельно получали вакцину перорально в течение 4 недель. Через 12 часов после каждой иммунизации у двух из трех добровольцев развивалась диарея, которая продолжалась 1-2 дня. У добровольцев субъектов, получавших высокие дозы антигена (60 или 180 мг), были обнаружены клетки, секретирующие антитела, а также уреазоспецифические сывороточные IgA. В то же время при иммунизации в дозе 20 мг уреазы в биоптатах желудка наблюдалось частичное сокращение количества колоний *H. pylori*, что свидетельствует о слабой корреляции между специфическими к уреазе IgA-антителами и снижением бактериальной нагрузки. Наконец, иммунизация не улучшила ранее существовавшее воспаление желудка. Причины неполных результатов этого исследования как в отношении иммуногенности, так и эффективности неясны. Они могут быть связаны с применяемой схемой вакцинации, составом вакцины, низкой дозой адьюванта. [4]. В 2002 году Banerjee с коллегами попытались улучшить профиль безопасности вакцины путем снижения доз термолабильного энтеротоксина *Escherichia coli* (LT), поскольку, предыдущее исследование показало, что доза LT, равная 5 мкг, вызывала побочные реакции в виде частой диареи. Вакцинный препарат был протестирован на 42 *H. pylori*-отрицательных добровольцах, которые принимали участие в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании. Участники исследования на 1, 7, 28 и 56-сутки перорально получали 60 мг рекомбинантной уреазы, либо в растворимой, либо в инкапсулированной (кислотоустойчивой) форме с добавлением LT в дозах 0,1, 0,5, 2,5 мкг. Были получены результаты, согласно которым у 50% лиц, получавших вакцину с высокой дозой адьюванта LT (2,5 мкг) после первой и второй иммунизации наблюдалась легкая диарея, но она отсутствовала у лиц, которые получали низкие дозы (0,1 и 0,5 мкг) адьюванта LT. У субъектов, получавших самую

высокую дозу LT (2,5 мкг), был обнаружен антительный ответ. Антитела против термолабильного энтеротоксина *Escherichia coli* обнаруживались только у одного из добровольцев. Наконец, у добровольцев, получавших высокую дозу LT, наблюдалось увеличение количества CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток после пятого (дополнительного) перорального введения вакцины на 64 день. Таким образом, определение безопасной и эффективной дозы LT для человека с целью устранения нежелательных побочных эффектов, таких как диарея, представляет собой потенциально важный шаг в разработке подобных пероральных вакцин, включая вакцины против *H. pylori* [65]. Еще одной попыткой обойти проблемы безопасности явилась замена перорального способа вакцинации ректальным способом. С этой целью был применен вакцинный препарат, который содержал рекомбинантную уреазу с различными дозами адьюванта LT (5 мкг и 25 мкг). Уреазу в дозе 60 мг вводили ректально здоровым *H. pylori*-отрицательным взрослым волонтерам совместно с 5 или 25 мкг адьюванта (LT) трижды на 0, 14 и 28 сутки. Сильный антительный ответ против LT выявлялся системно у большинства вакцинированных, в основном в группе волонтеров, получавших самую низкую дозу LT (5 мкг). Только у нескольких лиц, развивался системный ответ на антитела против уреазы класса IgG и IgA. Однако в образцах кала или слюны не было обнаружено антител против уреазы или против LT класса IgA. В то же время, пролиферативный ответ, обусловленный уреазой, и продукция INF- $\gamma$  были незначительными. Необходимо также отметить, что ни один из добровольцев после вакцинации различными дозами LT не сообщал о побочных реакциях в виде диареи [66]. Приведенные данные показывают, что пероральное введение рекомбинантной уреазы и, вероятно, других антигенов требует использования сильных и безопасных адьювантов для индукции ответа на уровне слизистой оболочки в достаточно высоких дозах, вызывающих адьювантный эффект без развития диареи. Кроме того, как пероральный, так и ректальный способы применения требуют разработки

соответствующих составов, способных индуцировать адекватные защитные иммунные реакции против *H. pylori*.

В качестве альтернативы очищенным рекомбинантным антигенам, живые аттенуированные вакцинные штаммы *Salmonella spp.*, могут экспрессировать большое количество чужеродных антигенов и широко используются в качестве систем-переносчиков при создании векторных вакцин [67]. В целом, рекомбинантные вакцины на основе сальмонелл могут вводиться пероральным путем и вызывать сильные реакции слизистой оболочки и системных В- и Т-клеток против гетерологичного антигена на различных моделях животных [68, 69].

В качестве вакцинного препарата предложено использовать безопасный мутантный штамм *Salmonella typhi* (Ty1033) с делецией *phoP/phoQ* (отвечает за вирулентность) и экспрессирующий субъединицы А и В уреазы *H. pylori*. Из 8 принявших участие в испытании *H. pylori*-отрицательных добровольцев семь получали однократные пероральные дозы ( $1 \times 10^{10}$  и  $4 \times 10^{10}$  КОЕ), восьмой доброволец получал две дозы (первая -  $1 \times 10^{10}$  КОЕ, вторая -  $4 \times 10^{10}$  КОЕ) с интервалом в 3 месяца. После вакцинации участники испытания находились под наблюдением стационаре 1 неделю. В течение 36 часов после иммунизации у четырех добровольцев наблюдался синдром, похожий на гастроэнтерит средней тяжести с частым водянистым стулом, спазмами в животе и однократным повышением температуры. Остальные лица чувствовали себя нормально. У всех добровольцев на 7-й день после вакцинации в периферической крови было обнаружено увеличение количества IgA-секретирующих лимфоцитов, направленных против ЛПС антигена *S. typhi*. У 7 из 8 лиц наблюдались повышенные уровни сывороточных антител класса IgA, направленных против ЛПС *S. typhi*. Однако ни у одного из 8 добровольцев не было выявлено заметных реакций слизистой оболочки или развития гуморальных иммунных реакций на антиген уреазы [70].

Несколько иные результаты были получены в последующем исследовании, где в качестве вакцинного штамма использовалась *Salmonella*

*enterica serovar typhimurium* с той же делецией *phoP/phoQ* и экспрессирующая уреазу *H. pylori*. Шестеро *H. pylori*-отрицательных добровольцев получали однократные пероральные дозы ( $5 \times 10^7$  и  $8 \times 10^7$  КОЕ) ослабленного вакцинного штамма, а затем в течение 10 дней находились под пристальным наблюдением в больнице. У двух из шести лиц через 22-76 часов после вакцинации развилась острая лихорадка. Пациенты жаловались на головную боль и спазмы в животе, однако ни у одного не было рвоты и диареи. В течение 36 часов после достижения максимальной температуры симптомы начали проходить без применения какой-либо терапии. Остальные четверо добровольцев после вакцинации чувствовали себя хорошо на протяжении всего исследования. У 5 из 6 лиц наблюдалась сероконверсия в отношении антигенов *Salmonella enterica serovar typhimurium* (ЛПС и флагеллин жгутиков). Авторы также продемонстрировали, что однократное пероральное введение вакцинного штамма приводило к появлению гуморальных иммунных реакций на уреазу. У троих из шести иммунизированных добровольцев наблюдались IgG-антитела против уреазы *H. pylori*. Только у одного из 6 добровольцев определялись клетки, секретирующие IgA-антитела, выявлялась продукция антител против уреазы классов IgA и IgG [71].

Еще одну профилактическую вакцину на основе сальмонеллы предложили D. Vumann с коллегами, которые сконструировали штамм *Salmonella enterica serovar typhi* (Ty21a), содержащий плазмиду (pDB1), экспрессирующую субъединицы А и В уреазы *H. pylori*. В исследовании приняли участие 12 здоровых добровольцев, 9 из которых получали три пероральных дозы (1-я доза:  $6 \times 10^9$  КОЕ; 2-я доза:  $7 \times 10^9$  КОЕ; 3-я доза:  $9 \times 10^9$  КОЕ) вакцинного штамм Ty21a (pDB1), а трое добровольцев были отнесены к группе контроля и получали три пероральных дозы (1-я доза:  $6 \times 10^9$  КОЕ; 2-я доза:  $7 \times 10^9$  КОЕ; 3-я доза:  $9 \times 10^9$  КОЕ) *Salmonella enterica serovar typhi* (Ty21a). У одного из участников контрольной группы после введения первой дозы вакцины наблюдались спазмы в животе и диарея, а после второй дозы он жаловался на головную боль. Еще один доброволец, получавший вакцинный

штамм Ty21a (pDB1), сообщил о временных болях в животе и метеоризме после третьей дозы вакцинации. Во всех случаях симптомы прошли без лечения. В то же время ни у одного из 12 добровольцев не было лихорадки и значительных побочных эффектов. В ходе данного исследования была оценена безопасность и способность Ty21a (pDB1) вызывать гуморальные и клеточные реакции на антигены *Salmonella enterica serovar typhi* (Ty21a) и рекомбинантную уреазу *H. pylori*. Было показано, что среди 12 добровольцев, иммунизированных как Ty21a, так и Ty21a (pDB1) на 7-й день после вакцинации в крови 10 лиц были обнаружены клетки, продуцирующие антитела против ЛПС и О-антигена *Salmonella enterica serovar typhi* (Ty21a), однако через 14 дней после иммунизации в периферической крови добровольцев данные клетки не обнаруживались. В то же время ни у одного из 9 добровольцев, иммунизированных на 0-й, 7-й и 14-й день вакцинным штаммом Ty21a (pDB1) не было выявлено в значительных количествах клеток, продуцирующих антитела против уреазы. Таким образом, Ty21a (pDB1) не вызывал гуморального ответа на уреазу, однако у трех из девяти добровольцев, получивших данный вакцинный штамм наблюдался четко определяемый Т-клеточный ответ против уреазы [72]. В ходе этого клинического испытания было показано, что рекомбинантный Ty21a (pDB1) может служить в качестве прототипа вакцины на основе сальмонеллы, однако требуется доработка вакцины с целью достижения эффективных клеточных реакций, которые могли бы опосредовать защитный иммунитет против *H. pylori*.

В последующем исследовании Metzger с коллегами задались вопросом о возможном влиянии уже существующего иммунитета к антигенам-носителя (Ty21a) на клеточные реакции в ответ на рекомбинантный антиген. В исследовании принимали участие двадцать здоровых добровольцев, у которых отсутствовала *H. pylori*-инфекция. За 12 месяцев до повторного введения трех доз рекомбинантной вакцины Ty21a (pDB1) четыре добровольца были иммунизированы вакцинным штаммом Ty21a, который содержал плазмиду

pDB1, экспрессирующую субъединицы А и В рекомбинантной уреазы *H. pylori* (1-я доза:  $6 \times 10^9$  КОЕ; 2-я доза:  $7 \times 10^9$  КОЕ; 3-я доза:  $9 \times 10^9$  КОЕ) Тринадцать здоровых добровольцев были предварительно за 2 месяца до введения трех доз рекомбинантной вакцины (n=9) Ty21a (pDB1) или штамма-носителя (n=4) (Ty21a) иммунизированы штаммом-носителем *Salmonella enterica serovar typhi* (Ty21a) (1-я доза:  $6 \times 10^9$  КОЕ; 2-я доза:  $7 \times 10^9$  КОЕ; 3-я доза:  $9 \times 10^9$  КОЕ) Трех добровольцам был введен вакцинный штамм Ty21a (pDB1) без предварительной иммунизации. После введения вакцины ни у одного из добровольцев не было отмечено серьезных побочных эффектов. Для оценки иммунных реакций сравнивали гуморальные и клеточные параметры на 0, 7 и 28-й дни. У добровольцев до вакцинации не было обнаружено клеток, секретирующих антитела к антигенам Ty21a или к рекомбинантной уреазе *H. pylori*. На седьмой день после вакцинации у одного из них были выявлены клетки, секретирующие антитела против ЛПС Ty21a. На 28-й день ни у одного из добровольцев не были выявлены клетки, секретирующие антитела против антигенов штамма-носителя Ty21a или рекомбинантной уреазы. Перед вакцинацией положительные титры антител к антигенам Ty21a были обнаружены у 9 из 17 предварительно иммунизированных участников и у одного из трех добровольцев, не прошедших предварительную иммунизацию. У четырех лиц, прошедших предиммунизацию и у всех трех лиц, не прошедших предиммунизацию, была выявлена сероконверсия. В то же время необходимо отметить, что ни у одного из участников исследования ни до, ни после вакцинации не было выявлено титров антител против рекомбинантной уреазы *H. pylori*. Однако, у 4 из девяти добровольцев, предварительно иммунизированных Ty21a, наблюдался клеточный иммунный ответ против уреазы *H. pylori*, что подтверждает результаты предыдущего исследования, показавшего, что рекомбинантная живая пероральная вакцина на основе *S. typhi* Ty21a в качестве вектора способна вызывать клеточный иммунный ответ на рекомбинантный антиген. Следовательно, *S. typhi* Ty21a/DB1 является

полезным инструментом в разработке живой пероральной вакцины против *H. pylori* [73].

Та же конструкция рекомбинантной *Salmonella* Ty21a, экспрессирующая уреазу была протестирована Aebischer с коллегами в 2008 году на здоровых добровольцах, которые затем были заражены *H. pylori*. Авторы продемонстрировали, что вакцинный препарат хорошо переносился добровольцами, однако не обеспечивал полноценной защиты против *H. pylori*-инфекции [14].

В 2001 году сообщено о первом испытании на людях инактивированной цельноклеточной пероральной вакциной против *H. pylori*. Цельноклеточные вакцины обладают преимуществом в том, что вызывают иммунный ответ против широкого спектра антигенов. Цельноклеточная вакцина против *H. pylori*, инактивированная формалином, была оценена в ходе испытаний I фазы как у *H. pylori*-позитивных, так и *H. pylori*-негативных лиц. Вакцину в различных дозировках ( $2,5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^8$ ,  $2,5 \times 10^{10}$ ) вводили перорально трижды на 0, 14 и 28 день вместе с 25 мкг модифицированной формой термалабильного энтеротоксина *Escherichia coli* (LTR192G) в качестве адьюванта. Вакцинация вызывала реакцию на специфичные к *H. pylori* антитела только у лиц, получавших самую высокую дозу вакцины. Увеличение титров IgA и IgG было незначительным и наблюдалось только у *H. pylori*-позитивных субъектов. Количество клеток, секретирующих антитела, индуцированных вакциной, оставалось незначительным. Однако пролиферативные реакции мононуклеарных клеток периферической крови и выработка INF- $\gamma$  наблюдались только у *H. pylori*-негативных субъектов, которые получали самую высокую дозу вакцины. Последующая работа представляла собой рандомизированное двойное слепое исследование, в котором люди, инфицированные *H. pylori*, получали либо  $2,5 \times 10^{10}$  бактерий с 25 мкг LTR192G, либо плацебо с 25 мкг LTR192G. У вакцинированных лиц титры антител IgA в кале были значительно выше, чем у лиц, получавших плацебо. Однако одновременное введение вакцины с адьювантом лишь

незначительно влияло на реакцию сывороточных антигенспецифических IgA антител. Вакцинация лиц, инфицированных *H. pylori*, не приводила к уничтожению бактерий, поскольку уреазный дыхательный тест оставался положительным через 2, 6 и 7,5 месяцев после вакцинации. Неизвестно, повлияла ли вакцинация на степень поражения желудка, поскольку в этом исследовании не было представлено микробиологических данных. Наконец, диарея возникла у 5 лиц из 18 (28%), вакцинированных наибольшей дозой бактерий с адьювантом и у 1 из 3 (33%), получавших плацебо с адьювантом. Маловероятно, что диарея была вызвана остаточной активностью VacA, присутствующей в препарате вакцины, поскольку активность VacA, очень чувствительна к обработке формальдегидом. Более вероятно, что диарея была вызвана мутантным энтеротоксином LTR192G, который сохраняет большую часть своей токсической активности *in vitro* и *in vivo* на животных моделях [74].

Многообещающим исследованием считается работа, в которой изучалась безопасность и иммуногенность вакцины, состоящей из рекомбинантных VacA, CagA и NAP, вводимых внутримышечно с гидроксидом алюминия в качестве адьюванта. Пятьдесят семь здоровых добровольцев были случайным образом распределены в семь групп и получали вакцинный препарат в дозах 10 или 25 мкг каждого антигена (VacA, CagA и NAP). Из них 38 лиц получали три дозы вакцины ежемесячно, а 19 лиц получали три дозы вакцины каждую неделю. Добровольцы, прошедшие вакцинацию, находились под наблюдением в течение 5 месяцев. Для изучения стойкости и усиления иммунных реакций, вызванных вакциной, через 18-24 месяца после завершения первичной вакцинации, 36 добровольцев получили четвертую дозу вакцины, либо с низкой или высокой концентрацией антигена, в зависимости от группы, к которой они принадлежали. Авторы продемонстрировали, что вакцинный препарат, вводимый добровольцам и содержащий комплекс рекомбинантных белков как в низких, так и в высоких дозах, вызывал сильную реакцию сывороточных антител класса IgG против

антигенов, входящих в состав вакцины. Через месяц после введения третьей дозы вакцины, независимо от схемы иммунизации или дозировки, у всех пациентов наблюдалась сероконверсия, по крайней мере, к двум (в большинстве случаев к VacA и NAP) из трех антигенов, а в 86 % случаев ко всем трем антигенам (VacA, CagA и NAP). Через 4,5 месяца после третьей иммунизации титры антител к каждому из антигенов падали, но все еще превышали пороговые уровни. Также стоит отметить, что при всех схемах иммунизации имела место выработка не только специфических антител к компонентам вакцины, но и активация клеточного ответа. Было показано, что мононуклеарные клетки периферической крови доноров в ответ на рекомбинантные белки (CagA и VacA) индуцируют выработку INF- $\gamma$ , уровень которого сохранялся в течение 4,5 месяцев после вакцинации. В то же время уровень CagA-специфических антител был низким или не определялся, что позволяет предположить, что вакцина индуцировала антигенспецифическую Т-клеточную память. Повторная иммунизация через 18-24 месяца после первичной вакцинации выявила сильную реакцию антител к трем антигенам у всех пациентов и привела к увеличению титров антигенспецифических антител, что соответствует эффективному усиливающему эффекту вакцины [33].

Опубликована статья с оценкой эффективности вакцины, состоящей из рекомбинантных VacA, CagA и NAP. Взрослым добровольцам ( $n=63$ ), у которых был подтвержден отрицательный результат на инфекцию *H. pylori*, вводили ежемесячно три внутримышечные дозы вакцины или плацебо. Через месяц после третьей иммунизации участники исследования ( $n=34$ ) были заражены CagA-положительными штаммами *H. pylori*. Через 12 недель после заражения у шести (32%) из 19 человек в группе вакцинации и у шести (40%) из 15 человек в группе плацебо сохранялся положительный результат на *H. pylori*. Концентрация антител, специфичных к CagA, VacA и NAP были значительно выше в группе, получавшей вакцину, чем в группе, получавшей плацебо, через 12 недель после заражения. По сравнению с плацебо, вакцина

не обеспечивала дополнительной защиты от инфицирования *H. pylori* после заражения CagA-положительным штаммом, несмотря на усиление системных гуморальных реакций на ключевые антигены *H. pylori* [75].

Следует отметить, что все предыдущие испытания профилактических или терапевтических вакцин против *H. pylori* проводились исключительно на взрослых добровольцах. Однако в 2015 году было опубликовано исследование, в котором описаны результаты применения пероральной рекомбинантной вакцины против *H. pylori* у китайских детей в возрасте от 6 до 15 лет, ранее не инфицированных данным микроорганизмом. Ранее, в ходе 1 и 2 фазы клинических испытаний проведена оценка безопасности, иммуногенности и оптимальной дозы. В цитируемой работе авторы сообщили о результатах третьей фазы клинических испытаний. Каждая доза вакцины содержала 15 мг гибридных белков, состоящих из субъединицы уреазы В (ген, полученный от *H. pylori* 9803) и термолабильной субъединицы энтеротоксина В (ген, полученный от *E. coli* H44815). Слитые белки были очищены с помощью ионообменной хроматографии в сочетании с гель-фильтрационной хроматографией с чистотой более 80% и содержанием эндотоксинов менее 5 EU на дозу. В исследовании также применялся препарат плацебо, который, как и вакцина, был изготовлен в виде лиофилизированного порошка (разводился в 30 мл дистиллированной воды комнатной температуры перед использованием) и содержал только вспомогательные вещества, входящие в состав вакцины, но не гибридные белки. В исследовании приняли участие 4464 ребенка, которые были рандомизированы случайным образом в две группы в равном соотношении. Одна группа детей (n=2232) получала вакцину, а другая группа (n=2232) получала плацебо на 0, 14 и 28-й день (три дозы). Далее оценивалась частота встречаемости инфекции *H. pylori* среди детей через год после иммунизации.

В течение первого года наблюдения было зарегистрировано 64 случая инфицирования *H. pylori* (14 случаев, среди лиц, получавших вакцину и 50 случаев, среди лиц, получавших плацебо). Эффективность вакцины составила

71,8 % (95 % ДИ 48,2 – 85,6). По крайней мере об одной побочной реакции в течение трех дней после вакцинации сообщили 157 (7%) из 2216 участников, которые получали вакцину и 161 (7%) из 2211 участников, которые получали плацебо. Как в крови, так и в слюне лиц, иммунизированных вакциной против *H. pylori*, наблюдался повышенный уровень IgG и IgA против субъединицы уреазы В. Концентрация данных антител в группе, получавшей вакцину, оставалась высокой, без существенного снижения в течение первого года наблюдения. На основании проведенного исследования авторами было сделано заключение, что пероральная рекомбинантная вакцина против *H. pylori* является эффективной, безопасной и иммуногенной у *H. pylori*-негативных детей. Однако для получения прямых доказательств защиты от заболеваний, ассоциированных с *H. pylori*, необходимо более длительное наблюдение за вакцинированной группой. Кроме того, для долгосрочной защиты могут потребоваться повторные дозы в соответствующие сроки [76].

В заключение следует отметить, что иммунологические изменения, происходящие в организме человека при инвазии *H. pylori*, сложны и многообразны. К сожалению, вакцины, которая могла бы быть рекомендована у людей к использованию в рутинной практике, пока не существует, несмотря на более чем 30-летнюю историю создания вакцин и большое количество примеров эффективности вакцин у животных. Механизмы действия вакцин у животных и человека выяснены недостаточно и нуждаются в дальнейшем уточнении. На сегодняшний день перспективным направлением в совершенствовании вакцин против *H. pylori* является применение эффективных мукозальных адъювантов и использование иммуностимулирующих пробиотиков во время введения вакцины или рекомбинантных полезных бактерий, экспрессирующих иммуногенные антигены *H. pylori*. Не следует забывать, что побочные эффекты вакцинации против *H. pylori* еще не полностью изучены, что также требует совершенствования методов создания вакцин.

### Список литературы

1. Baryshnikova N.V., Suvorov A.N., Tkachenko E.I. et al. The role of genetic features of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of diseases of the digestive system: from theory to practice // Experimental and clinical gastroenterology. – 2009. – Vol. 1. P. – 12-19.
2. Giudice G. D, Covacci A., Telford J.L. et al. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development //Annu Rev Immunol. – 2001. – Vol. 19. – P. 523-563.
3. Vorobjova T., Watanabe T., Chiba T. *Helicobacter pylori* immunology and vaccines // Helicobacter. – 2008. – Vol. 13, Suppl. 1. – P. 18–22.
4. Michetti P., Kreiss C., Kotloff K.L. et al. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults // Gastroenterology. – 1999. – Vol. 116, Suppl. 4. – P. 804-812.
5. Corthésy-Theulaz I.E., Hopkins S., Bachmann D. et al. Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* phoPc expressing urease A and B subunits //Infect. Immun. – 1998. – Vol. 66, Suppl. 2. – P. 581-586.
6. Lee M.H., Roussel Y., Wilks M., Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice // Vaccine. – 2001. – Vol. 19, Suppl. 28-29. – P. 3927-3935.
7. Guo L., Yang H., Tang F. et al. Oral Immunization with a Multivalent Epitope-Based Vaccine, Based on NAP, Urease, HSP60, and HpaA, Provides Therapeutic Effect on *H. pylori* Infection in Mongolian gerbils. // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2017. – Vol. 7. – P. 349.
8. Zhou Z., Dong H., Huang Y. et al. Recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing cholera toxin B subunit and *Helicobacter pylori* urease B confer

- protection against *H. pylori* in mice // *J. Med. Microbiol.* – 2017. – Vol. 66, Suppl. 1. – P. 83-89.
9. Guo L., Yin R., Xu G. et al. Immunologic properties and therapeutic efficacy of a multivalent epitope-based vaccine against four *Helicobacter pylori* adhesins (urease, Lpp20, HpaA, and CagL) in Mongolian gerbils // *Helicobacter.* – 2017. – Vol. 22, Suppl. 6.
  10. Chirani A.S., Ghazi M., Goudarzi M. et al. A survey on chimeric UreB<sub>229-561</sub>-HpaA protein targeting *Helicobacter pylori*: Computational and *in vitro* urease activity valuation // *Comput. Bio. Chem.* – 2018. – Vol. 76. – P. 42-52.
  11. Yang J., Dai L.X., Pan X. et al. Protection against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice by oral administration of multi-epitope vaccine of CTB-UreI-UreB // *Pathog. Dis.* – 2015. – Vol. 73, Suppl. 5. – P. ftv026.
  12. Zhou W.Y., Shi Y., Wu C. et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27, Suppl. 36. – P. 5013-5019.
  13. Zhong Y., Chen J., Liu Y. et al. Oral immunization of BALB/c mice with recombinant *Helicobacter pylori* antigens and double mutant heat-labile toxin (dmLT) induces prophylactic protective immunity against *H. pylori* infection // *Microb. Pathog.* – 2020. – Vol. 145. – P. 104229.
  14. Aebischer T., Bumann D., Epple H.J. et al. Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines // *Gut.* – 2008. – Vol. 57, Suppl. 8. – P. 1065-1072.
  15. Xu Cю, Li Z.S., Du Y.Q. et al. Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* DNA vaccine expressing *H. pylori* ureB and IL-2 // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, Suppl. 6. – P. 939-944.
  16. Smythies L.E, Novak M.J., Waites K.B. et al. Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease protect mice against *H. pylori* infection // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23, Suppl. 7. – P. 901-909.

17. Guo L., Liu K., Xu G. et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of the epitope vaccine CTB-UA against *Helicobacter pylori* infection in a BALB/c mice model // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – Vol. 95, Suppl. 6. – P. 1437-1444.
18. Guo L., Liu K., Zhao W. et al. Immunological features and efficacy of the reconstructed epitope vaccine CtUBE against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97, Suppl. 6. – P. 2367-2378.
19. Guo L., Hong D., Wang S. et al. Therapeutic Protection Against *H. pylori* Infection in Mongolian Gerbils by Oral Immunization With a Tetravalent Epitope-Based Vaccine With Polysaccharide Adjuvant // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1185.
20. Ruiz-Bustos E., Sierra-Beltran A., Romero M.J. et al. Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunisation with *H. pylori* heparan sulphate-binding proteins coupled to cholera toxin beta-subunit // *J. Med. Microbiol.* – 2000. – Vol. 48, Suppl. 6. – P. 535-541.
21. Wang L., Liu X.F., Yun S. et al. Protection against *Helicobacter pylori* infection by a trivalent fusion vaccine based on a fragment of urease B-UreB414 // *J. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, Suppl. 2. – P. 223-228.
22. Morihara F., Fujii R., Hifumi E. et al. Effects of vaccination by a recombinant antigen ureB138 (a segment of the beta-subunit of urease) against *Helicobacter pylori* infection // *J. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 56, Suppl. 6. – P. 847-853.
23. Song H., Lv X., Yang J. et al. A novel chimeric flagellum fused with the multi-epitope vaccine CTB-UE prevents *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in a BALB/c mouse model // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2015. – Vol. 99, Suppl. 22. – P. 9495-9502.
24. Tan Z., Liu W., Liu H. et al. Oral *Helicobacter pylori* vaccine-encapsulated acid-resistant HP55/PLGA nanoparticles promote immune protection // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2017. – Vol. 111. – P. 33-34.

25. Liu H., Liu W., Tan Z. et al. Promoting Immune Efficacy of the Oral *Helicobacter pylori* Vaccine by HP55/PBCA Nanoparticles against the Gastrointestinal Environment // Mol. Pharm. – 2018. – Vol. 15, Suppl. 8. – P. 3177-3186.
26. Liu W., Tan Z., Xue J. et al. Therapeutic efficacy of oral immunization with a non-genetically modified *Lactococcus lactis*-based vaccine CUE-GEM induces local immunity against *Helicobacter pylori* infection // Appl Microbiol Biotechnol. – 2016. – Vol. 100, Suppl. 14. – P. 6219-6229.
27. Pan X., Ke H., Niu X. et al. Protection Against *Helicobacter pylori* Infection in BALB/c Mouse Model by Oral Administration of Multivalent Epitope-Based Vaccine of Cholera Toxin B Subunit-HUUC // Front Immunol. – 2018. – Vol. 9. – P. 1003.
28. Ghasemi A., Mohammad N., Mautner J. et al. Immunization with recombinant FliD confers protection against *Helicobacter pylori* infection in mice // Mol Immunol. – 2018. – Vol. 94. – P. 176-182.
29. Ghasemi A., Mohammad N., Mautner J. et al. Immunization with a recombinant fusion protein protects mice against *Helicobacter pylori* infection // Vaccine. – 2018. – Vol. 36, Suppl. 34. – P. 5124-5132.
30. Cen Q., Gao T; Ren Y. et al. Immune evaluation of a *Saccharomyces cerevisiae*-based oral vaccine against *Helicobacter pylori* in mice // Helicobacter. – 2021. – Vol. 26, Suppl. 1. – P. e12772.
31. Wang S., Ma J., Ji Q., Liu Q. Evaluation of an attenuated *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector to control *Helicobacter pylori* infection // Immunol Lett. – 2021. – Vol. 238. – P. 68-74.
32. Liu K.Y., Shi Y., Luo P. et al. Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model // Vaccine. – 2011. – Vol. 29, Suppl. 38. – P. 6679-6685.
33. Malfertheiner P., Schultze V., Rosenkranz B. et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in

- noninfected volunteers: a phase I study // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 135, Suppl. 3. – P. 787-795.
34. Abadi A.H., Mahdavi M., Khaledi A. et al. Study of serum bactericidal and splenic activity of Total-OMP- CagA combination from *Brucella abortus* and *Helicobacter pylori* in BALB/c mouse model // *Microb Pathog.* – 2018. – Vol. 121. – P. 100-105.
35. Paydarnia N., Mansoori B., Esmaeili D. et al. *Helicobacter pylori* recombinant CagA regulates Th1/Th2 balance in a BALB/c murine model // *Adv Pharm Bull.* – 2020. – Vol. 10, Suppl. 2. – P. 264-270.
36. Zhang R., Duan G., Shi Q. et al. Construction of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing a fusion protein of Omp22 and HpaA from *Helicobacter pylori* for oral vaccine development // *Biotechnol Lett.* – 2016. – Vol. 38, Suppl. 11. – P. 1911-1916.
37. Talluri E., Pancotto L., Ruggiero P. et al. CagL from *Helicobacter pylori* has ADP-ribosylation activity and exerts partial protective efficacy in mice // *Arch Biochem Biophys.* – 2017. – Vol. 635. – P. 102-109.
38. Tobias J., Lebens M., Wai S.N. et al. Surface expression of *Helicobacter pylori* HpaA adhesion antigen on *Vibrio cholerae*, enhanced by co-expressed enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens // *Microb Pathog.* – 2017. – Vol. 105. – P. 177-184.
39. Li Y., Chen Z., Ye J. et al. Antibody Production and Th1-biased Response Induced by an Epitope Vaccine Composed of Cholera Toxin B Unit and *Helicobacter pylori* Lpp20 Epitopes // *Helicobacter.* – 2016. – Vol. 21, Suppl. 3. – P. 234-248.
40. Zhang R., Wang C., Cheng W. et al. Delivery of *Helicobacter pylori* HpaA to gastrointestinal mucosal immune sites using *Lactococcus lactis* and its immune efficacy in mice // *Biotechnol Lett.* – 2018. – Vol. 40, Suppl. 3. – P. 585-590.

41. O'Riordan A.A., Morales V.A., Mulligan L. et al. Alkyl hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30, Suppl. 26. – P. 3876-3884.
42. Talebkhan Y., Bababeik M., Esmaeili M. et al. *Helicobacter pylori* bacterial ghost containing recombinant Omp18 as a putative vaccine // *J. Microbiol. Methods*. – 2010. – Vol. 82, Suppl. 3. – P. 334-337.
43. Jiang Z., Huang A.L., Tao X.H., Wang P.L. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M(r)18,000 OMP from *Helicobacter pylori* // *World J. Gastroenterol*. – 2003. – Vol. 9, Suppl. 8. – P. 1756-1761.
44. Yamaguchi H., Osaki T., Taguchi H. et al. Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 // *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. – 2003. – Vol. 10, Suppl. 5. – P. 808-812.
45. Chen J., Lin M., Li N. et al. Therapeutic vaccination with Salmonella-delivered codon-optimized outer inflammatory protein DNA vaccine enhances protection in *Helicobacter pylori* infected mice // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 30, Suppl. 36. – P. 5310-5315.
46. Chen J., Li N., She F. *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein DNA vaccine-loaded bacterial ghost enhances immune protective efficacy in C57BL/6 mice // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32, Suppl. 46. – P. 6054-6060.
47. Lü L., Cao H.D., Zeng H.Q. et al. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155 vaccine expressing outer membrane protein 26 kDa antigen affords therapeutic protection against *Helicobacter pylori* infection // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27, Suppl. 7. – P. 972-978.
48. Hongying F., Xianbo W., Fang Y. et al. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing the adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* induces mucosal and systemic immune responses // *Clin. Vaccine Immunol*. – 2014. – Vol. 21, Suppl. 2. – P. 126-132.

49. Sun B., Li Z.S., Tu Z.X. et al. Construction of an oral recombinant DNA vaccine from *H. pylori* neutrophil activating protein and its immunogenicity // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12, Suppl. 43. – P. 7042-7046.
50. Yan J., Liang S.H., Mao Y.F. et al. Construction of expression systems for flaA and flaB genes of *Helicobacter pylori* and determination of immunoreactivity and antigenicity of recombinant proteins // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9, Suppl. 10. – P. 2240-2250.
51. Kim S.J., Jun D.Y., Yang C.H., Kim Y.H. Expression of *Helicobacter pylori* cag 12 gene in Lactococcus lactis MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol.72, Suppl. 3. – P. 462-470.
52. Yu Wen., Zhang Y., Jing J., Liu Z. Construction of *Helicobacter pylori* Lpp20-IL2 DNA vaccine and evaluation of its immunocompetence in C57BL/6 mice // Wei. Sheng Wu Xue Bao. – 2010. – Vol.50, Suppl. 4. – P. 554-559.
53. Soleimani N/, Mohabati Mobarez A., Tavakoli-Yaraki M., Farhangi B. Evaluation of nitric oxide production and proliferation activity of recombinant Bacterioferritin of *Helicobacter pylori* on macrophages // Microb Pathog. – 2016. – Vol.100, Suppl. 54. – P. 149-153.
54. Espinosa-Ramos D.; Caballero-Hernández D., Gomez-Flores R. et al. Immunization with a synthetic *Helicobacter pylori* peptide induces secretory IgA antibodies and protects mice against infection // Can. J. Infect. Dis. – 2019. – P. 8595487.
55. Liu Q., Li X., Zhang Y. Orally-administered outer-membrane vesicles from *Helicobacter pylori* reduce *H. pylori* infection via Th2-biased immune responses in mice // Pathog. Dis. – 2019. – Vol. 77, Suppl. 5. – P. ftz050.
56. Chehelgerdi M., Doosti A. Effect of the cagW-based gene vaccine on the immunologic properties of BALB/c mouse: an efficient candidate for *Helicobacter pylori* DNA vaccine // J. Nanobiotechnology. – 2020. – Vol.18, Suppl. 1. – P. 63.

57. Aliramaei M.R., Khorasgani M.R., Rahmani MR. Expression of *Helicobacter pylori* CagL gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and evaluation of its immunogenicity as an oral vaccine in mice // *Microb. Pathog.* – 2019. – Vol. 142 – P. 103926.
58. Peng X., Zhang R., Duan G. et al. Production and delivery of *Helicobacter pylori* NapA in *Lactococcus lactis* and its protective efficacy and immune modulatory activity // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, Suppl. 1. – P. 6435.
59. Xie W., Zhao W., Zou Z. et al. Oral multivalent epitope vaccine, based on UreB, HpaA, CAT, and LTB, for prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice // *Helicobacter.* – 2021. – Vol. 26, Suppl. 3. – P. e12807.
60. Liu Q., Tan K., Yuan J. et al. Flagellin-deficient outer membrane vesicles as adjuvant induce cross-protection of *Salmonella Typhimurium* outer membrane proteins against infection by heterologous *Salmonella* serotypes // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2018. – Vol. 308, Suppl. 7. – P. 796-802.
61. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2010. – Vol. 74, Suppl. 1. – P. 81-94.
62. Schild S., Nelson E.J., Camilli A. et al. Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice // *Infect Immun.* – 2008. – Vol. 76, Suppl. 10. – P. 4554-4563.
63. Camacho A.I., de Souza J., Sánchez-Gómez S. Mucosal immunization with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29, Suppl. 46. – P. 8222-8229.
64. Kreiss C., Buclin T., Cosma M. et al. Safety of oral immunisation with recombinant urease in patients with *Helicobacter pylori* infection // *Lancet.* – 1996. – Vol. 347, Suppl. 9015. – P. 1630-1631.
65. Banerjee S., Medina-Fatimi A., Nichols R. et al. Safety and efficacy of low dose *Escherichia coli* enterotoxin adjuvant for urease based oral

- immunisation against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers // Gut. – 2002. – Vol. 51, Suppl. 5. – P. 634-640.
66. Sougioultzis S., Lee C.K., Alsahli M. et al. Safety and efficacy of *E. coli* enterotoxin adjuvant for urease-based rectal immunization against *Helicobacter pylori* // Vaccine. – 2002. – Vol. 21, Suppl. (3-4). – P. 194-201.
67. Gómez-Duarte O.G, Bumann D., Meyer T.F. The attenuated *Salmonella* vaccine approach for the control of *Helicobacter pylori*-related diseases // Vaccine. – 1999. – Vol. 17, Suppl. (13-14). – P. 1667-1673.
68. Sirard J.C., Niedergang F., Kraehenbuhl J.P. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines // Immunol Rev. – 1999. – Vol. 171. – P. 5-26.
69. Bumann D., Hueck C., Aebischer T., Meyer T.F. Recombinant live *Salmonella spp.* for human vaccination against heterologous pathogens // FEMS. Immunol Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 27, Suppl. 4. – P. 357-364.
70. DiPetrillo M.D., Tibbetts T., Kleanthous H. et al. Safety and immunogenicity of phoP/phoQ-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers // Vaccine. – 1999. – Vol. 18, Suppl. (5-6). – P. 449-459.
71. Angelakopoulos H., Hohmann E.L. Pilot study of phoP/phoQ-deleted *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, Suppl. 4. – P. 2135-2141.
72. Bumann D., Metzger W.G., Mansouri E. et al. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers // Vaccine. – 2001. – Vol. 20, Suppl. (5-6). – P. 845-852.
73. Metzger W.G., Mansouri E., Kronawitter M. et al. Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant *Salmonella enterica* serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers // Vaccine. – 2004. – Vol. 22, Suppl. (17-18). – P. 2273-2277.

74. Kotloff K.L., Sztein M.B., Wasserman S.S. et al. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection // *Infect Immun.* – 2001. – Vol. 69, Suppl. 6. – P. 3581-3590.
75. Malfertheiner P., Selgrad M., Wex T. et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a parenteral vaccine against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers challenged with a Cag-positive strain: a randomised, placebo-controlled Phase 1/2 study // *Lancet Gastroenterol Hepatol.* – 2018. – Vol. 3, Suppl. 10. – P. 698-707.
76. Zeng M., Mao X.H., Li J.X. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial // *Lancet.* – 2015. – Vol. 386, Suppl. 10002. – P. 1457-1146.

## Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции

Ротавирусы (rota – колесо) были открыты в 1973 г. австралийской исследовательницей Bishop R.F. с соавторами, которые обнаружили в ультратонких срезах биоптатов двенадцатиперстной кишки детей с острым гастроэнтеритом вирусные частицы, сходные с вирусом эпизоотической диареи мышат (EDIM) [1].

Последовавшие за этим сообщения об обнаружении аналогичных вирусов у больных острым гастроэнтеритом убедительно показали этиологическую роль ротавирусов в возникновении небактериальной диареи у детей раннего возраста и взрослых. В 1980-х гг. уровень смертности детей в возрасте до 5 лет от диареи составлял 2,7 миллиона смертей в год, где ведущая роль принадлежала ротавирусам. С помощью эффективной ротавирусной вакцины можно было бы ежегодно предотвращать от 500 тыс. до 1 млн. смертных случаев детей первых лет жизни в мире [2-4].

Усилия исследователей во всем мире, направленные на разработку ротавирусных вакцин в период до 2005 г., завершились преквалификацией ВОЗ в 2006-2008 гг. 2-х живых аттенуированных вакцин для перорального применения: Rotarix™ (GSK, Бельгия) и RotaTeq™ (Merck & Co, США) [5]. Данный тип вакцин убедительно показал свою эффективность в области вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции: с 2005 по 2015 г. произошло значительное снижение смертности от острых заболеваний кишечника у детей в возрасте до 5 лет [6]. Однако снижение заболеваемости тяжелой диареей более чем на 80% наблюдалось лишь в развитых странах. В то же время применение живых пероральных вакцин в развивающихся странах снизило заболеваемость детской диареей только на 50% [6]. Пониженная эффективность антиротавирусной вакцинации в странах с высокой смертностью детей от диареи может быть связана со следующими факторами:

- различие генотипов Р у вакцинных штаммов и штаммов дикого типа, преобладающих на данной территории [7];

- вариации кишечной микробиоты. Недостаток питания у детей в развивающихся странах влияет на состав кишечной микробиоты. В ходе исследований на гнотобиотических поросятах было выявлено снижение эффективности ротавирусной вакцины, которое было связано с изменением состава микробиоты при недостаточном питании [8];

- экологическая энтеропатия – хроническое воспаление кишечника, часто встречающееся у детей в развивающихся странах и связанное с условиями проживания: антисанитария, контаминированная вода и пища [9];

- высокие титры нейтрализующих антител к ротавирусу в грудном молоке. В связи с высокой концентрацией данных антител во время грудного вскармливания может наблюдаться снижение иммуногенности живых аттенуированных вакцинных штаммов [10];

- секреторные антигены HBGA, к которым относятся антигены групп крови и Lewis-антигены. Данные антигены играют роль в проникновении ротавируса в клетку, связываясь с VP8\*. Лица, у которых HBGA присутствует в слизистой оболочке кишечника (секреторы), восприимчивы к ротавирусу в отличие от людей без HBGA (несекреторов). В разных странах доля секреторов колеблется от 50 до 90% [11];

- влияние других инфекций или иных живых аттенуированных пероральных вакцинных штаммов, таких как полиомиелит, холера и брюшной тиф, на формирование иммунного ответа против ротавируса [12].

Кроме этого стоит отметить, что живые аттенуированные вакцины не лишены риска возникновения инвагинации кишечника, редкого, болезненного и потенциально опасного для жизни явления кишечной непроходимости. Инвагинация может являться следствием репликации вакцинных штаммов ротавируса в кишечнике после перорального введения [13]. Первая лицензированная ротавирусная вакцина RotaShield (четырёхвалентный реассортант ротавируса человека и макака-резусов, RRV-TV) была снята с рынка в 1999 году из-за повышенного риска инвагинации [14]. В связи с этим

безопасность и преимущества ротавирусных вакцин стали предметом тщательного изучения.

В качестве альтернативы современным живым пероральным вакцинам были предложены следующие вакцины: инактивированные ротавирусные вакцины, субъединичные вакцины на основе белков ротавируса, вакцины на основе вирусоподобных частиц (ВпЧ). Вышеперечисленные типы вакцин лишены способности реплицироваться, и в связи с чем предполагается, что они обладают улучшенным профилем безопасности в отношении инвагинации кишечника. Потенциально повышенная эффективность этих типов вакцин может объясняться тем, что экологическая энтеропатия и уровень материнских антител не оказывают влияния на формирование иммунного ответа против ротавируса под действием этих вакцин.

Предлагались также подходы к созданию вакцин против ротавируса на основе рекомбинантных штаммов бактерий, вирусных векторов и мРНК-вакцины. Главный принцип действия таких типов вакцин основан на синтезе ротавирусных белков в организме хозяина либо рекомбинантными штаммами бактерий, либо самими клетками хозяина, трансфецированными с помощью вирусного вектора, либо мРНК-вакцинами. Однако в случае мРНК-вакцин существует проблема нацеливания эффекторных молекул на доставку в необходимые клетки. В настоящее время все типы вакцин, описанные выше, находятся как на стадии лабораторных исследований, так и на различных стадиях клинических испытаний.

Широкое распространение получило применение живых пероральных аттенуированных вакцин RotaTeq и Rotarix. Данные вакцины лицензированы более чем в 100 странах. RotaTeq представляет собой пентавалентную вакцину на основе реассортанта ротавируса человека и крупного рогатого скота со специфичностью G1, G2, G3, G4, P1[8] (Merck & Co., Вест-Пойнт, Пенсильвания, США). Rotarix – моновалентная вакцина на основе штамма ротавируса человека генотипа G1P[8] (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Бельгия). В клинических испытаниях, проводившихся в развитых странах, как

Rotarix, так и RotaTeq доказали свою высокую эффективность в снижении тяжелого течения ротавирусного гастроэнтерита (>85%) [15].

Мета-анализ многочисленных исследований действия вакцин Rotarix и RotaTeq в странах Латинской Америки показал, что эффективность вакцин против ротавирусной инфекции составила 53% [16].

Основная часть заболеваний ротавирусной природы приходится на развивающиеся страны Африки и Азии. Исследования эффективности вакцин RotaTeq и Rotarix, проведенные в данных регионах, показали, что обе вакцины также менее эффективны против ротавирусного гастроэнтерита, чем в развитых странах [17].

В дополнение к Rotarix и RotaTeq были разработаны и лицензированы пять живых аттенуированных ротавирусных вакцин: Rotavin-M1, Ланьчжоуская LLR, LLR3, ROTAVAC и ROTASIIL.

Моновалентная ротавирусная вакцина Rotavin-M1 (Polyvac, Вьетнам) содержит живой аттенуированный штамм ротавируса человека G1P[8] (KH0118-2003), выделенный от ребенка во Вьетнаме [18]. Rotavin-M1 была лицензирована во Вьетнаме в 2012 г.

ROTAVAC, (Bharat Biotech, Индия) моновалентная ротавирусная вакцина, была лицензирована в Индии в 2014 г. ROTAVAC содержит живой аттенуированный штамм ротавируса человека G9P [11], выделенный во Всеиндийском институте медицинских наук в Нью-Дели от бессимптомных новорожденных [19].

ROTASIIL, лиофилизированная пентавалентная ротавирусная вакцина (Институт сывороток Индии, Pvt. Ltd.), была лицензирована в Индии в 2017 г. ROTASIIL содержит пять живых аттенуированных реассортантных штаммов ротавируса человека и крупного рогатого скота G1, G2, G3, G4 и G9, продуцируемых в культуре клеток Vero [20].

Ланьчжоуский институт биологических продуктов разработал живую аттенуированную вакцину на основе ротавируса ягненка Ланьчжоу LLR-85 генотипа G10P[12] (Lanzhou Institute of Biological Products/Xinkexian Biological

Technology, Китай, 2000) [21]. На данный момент вакцина лицензирована в Китае с 2000 года [22].

В 2020 году китайскими исследователями была разработана трёхвалентная вакцина LLR3 на основе реассортантного штамма ротавируса ягнёнка LLR генотипа G10P[12], в котором сегмент, кодирующий VP7 ротавируса ягнёнка, был заменён на генные сегменты VP7 ротавируса человека генотипов G2, G3 и G4. Согласно результатам рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого многоцентрового исследования LLR3, проведённого на китайских младенцах в возрасте 6-13 недель, препарат обеспечивал существенную защиту от ротавирусного гастроэнтерита любой степени тяжести, вызванного любым серотипом, и показал хорошую иммуногенность и безопасность [23].

Четырёхвалентная вакцина UK-BRV, разработанная в Национальном институте здравоохранения (США) представляет собой реассортантный штамм ротавируса крупного рогатого скота G6P[5] с генами VP7 из распространённых штаммов ротавируса человека G1 (штамм D), G2 (DS-1), G3 (P) и G4 (ST-3) [24]. В ходе клинических испытаний вакцины UK-BRV были получены данные о высоком уровне безопасности и сильном иммунном ответе на антигены ротавируса. Показана возможность безопасного введения UK-BRV с другими вакцинами [25].

По мере появления новых данных о типовом разнообразии PBA, циркулирующего в Африке и Азии, на основе ротавируса крупного рогатого скота G6P[5] были разработаны реассортантные штаммы, содержащие гены VP7 из штаммов ротавируса человека генотипов G8 (штамм 1290) и G9 (штамм AU32), встречающихся в данных регионах [26]. В настоящее время в первой фазе клинических испытаний находятся шестивалентный и пятивалентный варианты вакцины на базе UK-BRV. Пятивалентная вакцина UK-BRV (генотипы G1–4, G9) разрабатывается в Бразилии (Instituto Butantan); шестивалентная вакцина (генотипы G1–4, G8, G9) проходит исследования в Китае (Wuhan Institute of Biological Products) [27].

Вакцина RV3-BB, разработанная на основе асимптоматического неонатального штамма ротавируса, выделенного в Австралии (G3P[6], RV3), проходила клинические испытания в Австралии, Новой Зеландии и Индонезии [28].

Было показано, что штамм G3P[6] (RV3) имеет несколько отличительных биологических характеристик:

- Вызывает иммунитет к возбудителю постнеонатальной ротавирусной инфекции у новорожденных до 3 лет, асимптоматически инфицированных данным штаммом;
- Реплицируется в кишечнике новорожденного даже при наличии высоких уровней материнских антител;
- Обеспечивает гетеротипический перекрестный иммунитет от других штаммов ротавируса человека [29].

RV3-BB является на настоящий момент единственным вакцинным штаммом, имеющим внешний капсидный белок VP4 генотипа P2[6], широко распространенного в странах Африки и Азии и гораздо реже встречающегося в развитых странах [30].

При создании инактивированных вакцин для профилактики ротавирусной инфекции научными группами по всему миру предлагаются следующие подходы инактивации: с помощью химических реагентов, посредством термической обработки и путём воздействия УФ или гамма-излучения.

Формальдегид, бета-пропиолактон и бинарный этиленмин обычно используются для инактивации таких вирусов, как грипп, полиомиелит и японский энцефалит. В 1993 г. показано, что кролики, иммунизированные штаммом ротавируса обезьян SA11, инактивированным формалином и введённым внутримышечным путем, были полностью защищены от заражения ротавирусом кроликов [31].

Американские исследователи во главе с Yuan [32] разработали вакцину с аттенуированным штаммом ротавируса человека Wa, инактивированным

бинарным этиленимином, и оценили эффективность вакцины с использованием гнотобиотических поросят. Гнотобиотические поросята восприимчивы к ротавирусу как человека, так и свиней, и у них развивается диарея в течение как минимум 6 дней после вирусной инфекции [33]. Внутримышечная инъекция поросьятам-гнотобионтам инактивированного штамма Wa показала значительное увеличение количества клеток, секретирующих антигенспецифические антитела, по сравнению с неиммунизированными группами, но, к сожалению, не продемонстрировала значительного защитного иммунного ответа против вирусной инфекции [33].

В отличие от химической обработки, которая вызывает структурные изменения вирусных антигенов, физическая обработка, такая как тепло, ультрафиолетовое (УФ) и гамма-облучение вирусов, является более щадящей по отношению к целостности антигена [34]. МакНил и др. предложили методы инактивации ротавируса с использованием обработки псораленом и длинноволновым (365 нм, 40 минут) УФ-облучением. Трех- или двухслойный мышинный ротавирус инактивировали псораленом/УФ-излучением, а затем иммунизировали мышей с адьювантом QS-21 или без него. Внутримышечная иммунизация ротавирусом, обработанным псораленом и УФ-излучением, последовательно индуцировала ротавирус-специфические реакции иммуноглобулина G; однако защита была неполной, и наблюдалось высвобождение вирусных частиц из клеток кишечного эпителия и выделение их с фекалиями [34].

В качестве альтернативной стратегии разработки инактивированных вакцин против ротавируса была предложена инактивация с помощью гамма-облучения. Шахрудин и др. протестировали иммуногенность ротавируса, инактивированного с помощью гамма-излучения в количестве 50 кГр, на мышах. При обработке вирусных частиц гамма-излучением такой дозы их репликация становилась невозможной. Исследование иммунизации мышей показало индукцию гуморальных иммунных ответов, специфичных для ротавируса и сравнимых с теми, которые индуцируются живыми штаммами

ротавируса без использования адъюванта. Однако, было невозможно рассчитать количество радиации, необходимое для достижения надлежащего уровня стерилизации [35].

В последнее время наиболее широко распространённым физическим методом инактивации ротавируса является термическая обработка. Цзян и др. предложили простой способ инактивации ротавируса путём инкубации в течение 2 часов при температуре 60°C. Вирусные частицы термически обработанного ротавируса штамма YK-1 были морфологически похожи на живые вирионы, и для них было подтверждено отсутствие инфекционности. Для определения эффективности вакцины был проведен эксперимент на мышах, и иммунизация двумя дозами антигена без адъюванта привела к образованию высоких титров специфичных к вирусу антител в сыворотке мышей [36].

Центром по контролю и профилактике заболеваний США разрабатывался подход с использованием термически-инактивированного цельного вируса. Вакцинный штамм CDC-9 представляет собой одногенный межгрупповой реассортант, в котором ген VP3 происходит от вируса G2P[4], а остальные - от вируса G1P[8] [37]. CDC-9 реплицируется в клетках Vero, полностью термически инактивируется, и трехслойные вирионы после последующих этапов очистки сохраняются. Когда к инактивированному штамму CDC-9 в качестве адъюванта был добавлен гидроксид алюминия, у мышей при внутримышечном введении вакцины наблюдался сильный иммунный ответ и защита от перорального заражения. Кроме этого, исследования моновалентного штамма CDC-9 (G1P[8]) на мышах продемонстрировали гетеротипический иммунитет против других человеческих штаммов [38].

Антигены в составе субъединичных вакцин против ротавирусной инфекции представляют собой один или несколько рекомбинантных белков ротавируса (VP6, VP8), способных вызывать иммунный ответ. Белки ротавируса обычно слиты с антигенами другого организма (эпитоп P2 столбнячного анатоксина, флагеллин FliC *Salmonella Typhimurium*), либо с другими вспомогательным

белками (мальтозо-связывающий белок). Слитые белки чаще всего синтезируются с помощью экспрессионной системы *Escherichia coli*.

Рекомбинантная субъединичная парентеральная ротавирусная вакцина, разработанная Национальным институтом здравоохранения США, представляет собой укороченный рекомбинантный белок VP8 ротавируса человека генотипов P[8], P[4] или P[6], экспрессируемый в *E. coli* [39]. Было продемонстрировано, что вакцина вызывает продукцию нейтрализующих антител у животных.

В США проводилась I фаза клинических испытаний моновалентной вакцины на основе белка VP8 генотипа P[8], слитого с эпитопом P2 столбнячного анатоксина (P2-VP8-P[8]). В ходе испытаний показана её безопасность и иммуногенность для взрослых лиц [40]. В последующих исследованиях вакцины в Южной Африке было установлено, что данная вакцина хорошо переносится и иммуногенна во всех возрастных группах: в ходе исследования были продемонстрированы высокие уровни анти-P2-VP8/сывороточных антител IgG и IgA. У иммунизированных вакциной P2-VP8-P[8] после перорального введения вакцины Rotarix наблюдалось подавление его репликации в кишечнике в отличие от группы плацебо. Но против гетеротипических штаммов ротавируса наблюдался незначительный иммунный ответ. В связи с этим в Южной Африке были проведены клинические испытания трёхвалентной вакцины P2-VP8-P[4],[6],[8], в ходе которых была показана её безопасность и иммуногенность [41].

Белок VP6, экспрессируемый в виде химеры с мальтозо-связывающим белком (MBP-VP6), продемонстрировал иммуногенность при интраназальном, интаректальном и пероральном введении мышам. При заражении ротавирусом вакцинированные мыши были почти на 100% защищены от репликации ротавируса в кишечнике, что зависело от введения эффективного адъюванта [42].

Учёные из Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов (Россия) разработали прототип вакцины против

ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8. Рекомбинантный белок состоит из фрагментов белков VP6 и VP8 ротавируса и флагеллина FliC *Salmonella Typhimurium*. Белок синтезировался с помощью экспрессионной системы *E. coli* [43]. Исследования иммуногенности вакцины FliCVP6VP8 проводили на линии мышей Balb-c. Для оценки защитной эффективности иммунизированным мышам перорально вводили мышинный ротавирус EDC, после чего в организме мышей наблюдалась продукция антиротавирусных антител IgA и IgG. Иммуногенность данной вакцины сопоставима с таковой у Rotarix [44].

Вакцины против ротавируса на основе ВпЧ имеют вид двухслойных или трёхслойных белковых частиц, морфологически похожих на ротавирусные частицы, но не имеющих в своём составе генетического материала в виде сегментов двуцепочечной РНК. ВпЧ лишены возможности репликации в организме пациента, и в связи с этим предполагается, что вакцина, антигеном в составе которой являются ВпЧ, будет иметь улучшенный профиль безопасности.

Трёхслойные ВпЧ ротавируса состоят из структурных белков VP2, VP4, VP6 и VP7. Протеазочувствительный белок VP4 (P) и/или гликопротеин VP7 (G) являются основными компонентами внешнего слоя и содержат в своём составе антигенные детерминанты. Средний слой трёхслойных частиц состоит из белка VP6, способного к самосборке и имеющего антигенные свойства. Внутренний слой содержит белок VP2. Двухслойные ВпЧ состоят из VP2 и VP6. Белковые компоненты ВпЧ могут быть получены с помощью различных систем экспрессии, включая системы на основе бактерий, дрожжей, растений, культур клеток насекомых и млекопитающих.

Исследовательской группой Медицинского колледжа Бэйлора (США) были предприняты попытки разработки рекомбинантной нереплицирующейся вакцины с использованием двухслойных или трёхслойных ВпЧ ротавируса. Для получения ВпЧ использовалась бакуловирусная экспрессионная система на основе культуры клеток насекомых. О'Нил и др. сравнили иммуногенность

и защитную эффективность вакцин на основе двухслойных ВпЧ, состоящих из белков VP2 и VP6, и трёхслойных ВпЧ, содержащих VP2, VP6 и VP7 генотипа G3. ВпЧ совместно с холерным токсином в качестве адьюванта вводились мышам перорально или интраназально. Различий в иммуногенности и защитной эффективности между группами двухслойных и трёхслойных ВпЧ выявлено не было, следовательно, защита достигалась без участия нейтрализующих антигенов VP7. Как для двухслойных, так и для трёхслойных ВпЧ реакции сывороточного IgG и кишечного IgA в группе интраназального введения были выше, чем в группе перорального введения, и все мыши, получавшие ВпЧ интраназально, были защищены от инфекции и последующей репликации вируса в клетках кишечника [45].

Юань и др., используя систему экспрессии на основе бакуловируса, создали двухслойные рекомбинантные ВпЧ (VP2 и VP6). VP6 получен из штаммов ротавируса обезьян SA11 или человека Wa; для получения VP2, в свою очередь, использовался штамм ротавируса крупного рогатого скота RF. Эффективность вакцины исследовали на гнотобиотических поросятах. Иммунизация поросят-гнотобионтов данными ВпЧ совместно с термолабильным токсином LT-R192G путём интраназального введения приводила к образованию достаточного количества антигенспецифических антител, но не смогла вызвать надлежащую реакцию нейтрализации. В результате ВпЧ, введенные интраназально с адьювантом, были иммуногенными, но не обеспечивали эффективной защиты от ротавирусной инфекции и диареи у гнотобиотических поросят. Таким образом, ВпЧ все еще нуждаются в улучшении из-за различий в эффективности в зависимости от моделей экспериментов на животных [46].

В Японии (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) была разработана вакцина на основе ВпЧ ротавируса человека генотипа G1P[8], полученных с помощью экспрессионной системы на основе растения *Nicotiana benthamiana*. В состав ВпЧ входят белки VP7, VP6 и VP2 [47]. В ходе I фазы клинических испытаний показана безопасность и иммуногенность вакцины. У вакцинированных

наблюдалась продукция анти-G1P[8] антител IgG, но не наблюдалось гетеротипического иммунного ответа [48].

В Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи (Россия) на основе ротавируса человека штамма Wa G1P[8] была получена вакцина «Гам-VLP-Rота», антигеном в составе которой являются ротавирусные ВпЧ, состоящие из белков VP2, VP4, VP6 и VP7. Для включения в состав ВпЧ выбраны 4 генотипа G и 2 генотипа P, распространённые в России: G1, G2, G4, G9, P[4], P[8]. Для наработки ротавирусных ВпЧ авторы исследования использовали бакуловирусную систему экспрессии в культуре клеток насекомых. Антигенность ВпЧ была подтверждена с помощью ИФА и иммуноблоттинга [49]

Исследование иммуногенности и безопасности вакцины «Гам-VLP-Rота» проводилось на модели новорождённых карликовых свиней. Введение вакцины осуществлялось внутримышечно трёхкратно совместно с адьювантом SEPPIC SWE. Тестирование вакцины показало, что она является хорошо переносимой и не вызывает инвагинацию кишечника у свиней. В ходе анализа иммуногенности вакцины выявлено, что при иммунизации свиней «Гам-VLP-Rота» наблюдались высокие уровни специфических антител IgG (в сыворотке) и IgA (в сыворотке и кишечнике), вируснейтрализующих антител и клеточно-опосредованного иммунитета [50].

Различными научными группами также ведутся исследования иммуногенности ВпЧ на основе белка ротавируса человека VP6. VP6 представляет собой белок среднего слоя капсида ротавируса и является наиболее распространённым структурным белком вириона. Интересно, что VP6 не индуцирует нейтрализующие антитела, но может обеспечить защиту от заражения ротавирусом и перекрестный иммунитет на мышинной модели [51]. Хотя иммунологический механизм не полностью определен, считается, что уровень сывороточного IgA, специфичного к VP6, является сильным суррогатным маркером иммунитета, индуцированного вакциной [52]. Было

обнаружено, что структуры, формируемые белком VP6 в ходе самосборки, существуют в форме нанотрубок, сфер или тримеров в зависимости от pH и других условий [52].

Сферические частицы VP6 образовывались при pH <5,5, но были неоднородны по размеру и диаметру. С другой стороны, в диапазоне pH 5,5–7,0 формировалась однородная большая трубка, а при pH 7,0 и выше собирались трубки малого радиуса 45 нм. Было показано, что иммунизация мышей нанотрубками VP6 вызывает гуморальную реакцию, которая коррелирует с защитой от заражения ротавирусом и обеспечивает более высокую степень защиты, чем иммунизация двухслойными ВпЧ ротавируса, содержащими тримеры VP2 или VP6 [53].

Иммунизация мышей нанотрубками VP6 совместно с другими антигенами, такими как ВпЧ норовируса или ВпЧ вируса Коксаки (двух- или трехвалентными) в качестве комбинированной вакцины индуцировала устойчивый иммунитет как против ротавируса, так и против других вирусов, что также объяснялось иммуномодулирующим действием нанотрубок VP6 [54, 55]. С другой стороны, недавние исследования показали, что нанотрубка VP6 не проявляет адъювантных свойств в присутствии мономерных антигенов или коротких пептидов [56]. Чтобы исследовать иммуномодулирующий эффект нанотрубок VP6, был поставлен эксперимент с двумя типами малых антигенов: Р-частицы, полученные из капсидного белка норовируса, и небольшие пептиды М2е вируса гриппа А, полученные из белка внеклеточного матрикса. Вакцинация только частицами Р вызывала низкий уровень антител IgG, но совместное введение нанотрубки VP6 с частицами Р показало значительно повышенный ответ антител. Однако ни пептид М2е отдельно, ни его комбинация с нанотрубками VP6 не показали существенных различий в уровнях IgG в сыворотке. Это означает, что иммуномодулирующий эффект нанотрубок VP6 эффективен только для антигенов в форме дисперсных частиц [56].

Был предложен вариант комбинированных ВпЧ, состоящих из внутреннего капсидного белка ротавируса VP6 и норовирусного капсидного белка VP1. В доклинических исследованиях ВпЧ вызывали сильный иммунный ответ у мышей и обеспечивали защиту от перорального заражения штаммами ротавируса [57].

Исследовательская группа Детской больницы Цинциннати (США) разработала наночастицы P24-VP8\*, состоящие из мономеров белка ротавируса VP8\*, встроенного во внешнюю поверхностную петлю Р-домена белка VP1 норовируса. На основании предыдущих исследований было подтверждено, что чужеродный антиген, состоящий из более чем 200 аминокислот, может быть встроен в область внешней петли Р-домена и индуцировать эффективные иммунные ответы [58]. Высокая иммуногенность и иммунологическая эффективность наночастиц P24-VP8\* была подтверждена на моделях мышей [59] и гнотобиотических свиней [60], причем в некоторых случаях эти эффекты наблюдались даже в отсутствие адьюванта. Другая группа исследователей из Детской больницы Цинциннати также исследовала возможность использования наночастиц S60, состоящих из 60 мономеров VP1 норовируса, в качестве платформы для вакцин [61]. Они ввели в S-домен VP1 норовируса мутации для эффективной сборки, такие как мутации R69A и тройные цистеиновые мутации (V57C/Q58C/S136C), и синтезировали икосаэдрические наночастицы S60, используя систему экспрессии *E. coli*. Затем были созданы химерные частицы S60-VP8\*, содержащие 60 белков VP8\*, слитых с С-концом S-домена VP1, и оценен их вакцинный потенциал. Далее мышей иммунизировали наночастицами S60-VP8\*, используя в качестве контроля VP8\*, вводимый совместно с алюминиевыми квасцами. После вакцинации тремя дозами в группе наночастиц S60-VP8\* наблюдалась значительно улучшенная иммуногенность [61], а дальнейшие эксперименты с наночастицами S60-mVP8\*, на которых экспонируются антигены ротавируса мышей mVP8\*, показали иммунные реакции против ротавируса мышей [62]. В целом было показано, что

наночастицы на основе капсидных белков, таких как S и P-фрагменты VP1 норовируса, могут эффективно использоваться для представления антигенов ротавируса иммунной системе [56].

Сообщалось об исследовании с использованием наночастиц на основе ферритина. Ферритин, слитый с VP6 ротавируса (VP6-ферритин), экспрессировался в системе *E. coli*, и мономеры VP6-ферритина самоорганизовывались в однородные сферические структуры, аналогичные ферритину *in vitro*. Пероральное введение мышам VP6-ферритина без субъединицы В холерного токсина в качестве адъюванта индуцировало более высокий уровень гуморальных иммунных ответов, чем введение свободного VP6. Более того, наночастицы VP6-ферритина экспрессировались в молоке трансгенных мышей, и введение этого молока через зонд вызывало значительное уменьшение симптомов диареи во время ротавирусной инфекции [63].

Группой учёных из Московского государственного университета имени Ломоносова был предложен способ создания вакцины против ротавирусной инфекции на основе белков двух растительных вирусов: вируса табачной мозаики (ВТМ) и вируса мозаики альтернантеры (ВМальт). В качестве антигена в составе данной вакцины выступает химерный белок ER6, состоящий из белка оболочки ВМальт (БО ВМальт), слитого с эпитопом RV14 белка VP6 ротавируса. Эпитоп RV14 является консервативным для многих штаммов ротавируса и способен вызывать эффективный иммунный ответ. ВТМ термически обрабатывался и формировал сферические частицы, способные сорбировать на своей поверхности антиген ER6. Таким образом, сферические частицы ВТМ выступали в качестве адъюванта и платформы для презентации рекомбинантного химерного белка [64].

Методом иммунофлюоресцентной микроскопии было показано, что антитела способны взаимодействовать с эпитопом RV14 в составе комплексов ER6-сферические частицы ВТМ. Это доказывает, что такие комплексы могут

рассматриваться как антиген в составе вакцины для профилактики ротавирусной инфекции [64].

В совокупности эти результаты подтверждают перспективность использования наночастиц или ВпЧ в качестве эффективных платформ для презентации гетерологичных антигенов ротавируса.

Laimbacher и др. сконструировали ампликонные векторы вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) для совместной экспрессии структурных генов ротавируса VP2, VP6 и VP7. Полученные векторы использовались в качестве платформ для запуска производства вирусоподобных частиц ротавируса в инфицированных вектором клетках млекопитающих. Несмотря на наблюдаемый сплайсинг РНК VP6, продуцировался полноразмерный белок VP6 и образовывались ротавирусные ВпЧ. Двухкратная внутримышечная инъекция мышам векторов-ампликонов без адьювантов приводила к ротавирус-специфическим гуморальным иммунным ответам и, что наиболее важно, иммунизированные мыши были частично защищены на уровне слизистой оболочки от заражения живым ротавирусом дикого типа [65].

Исследователями из Института медицинской биологии Китайской академии медицинских наук была синтезирована вакцина против ротавируса на основе аденовирусного вектора. В ходе экспериментов был получен рекомбинантный аденовирус, содержащий гены VP7 и NSP4 ротавируса (rAd-VP7-NSP4), а также аденовирусы, содержащие гены VP7 и NSP4 по отдельности (rAd-VP7 и rAd-NSP4). Эффективность трансфекции культуры клеток Vero полученными аденовирусными векторами подтверждена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блот анализа [66].

Иммуногенность векторной вакцины оценивали на модели мышей линии ICR. Иммунизация мышей тремя аденовирусными векторами осуществлялась путем внутримышечного или интраназального введения. Данные показали значительное увеличение сывороточных антител, пролиферации субпопуляций Т-лимфоцитов и секреции цитокинов спленоцитами во всех

иммунизированных группах. Однако уровни сывороточного IgA и нейтрализующих антител в группах rAd-NSP4-VP7 или rAd-VP7 были значительно выше, чем в группе rAd-NSP4, в то время как количество спленоцитов, секретирующих IFN- $\gamma$ , в группах rAd-NSP4-VP7 или rAd-NSP4 было больше, чем в группе rAd-VP7. Кроме того, оценка эффективности на мышинной модели показала, что только rAd-NSP4-VP7 обеспечивает значительную защиту от заражения ротавирусом. Эти результаты позволяют предположить, что совместная экспрессия NSP4 и VP7 в аденовирусном векторе эффективно индуцирует как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ и обеспечивает потенциальную эффективность защиты от ротавирусного заболевания [66].

Южноафриканскими исследователями из университета Кейптауна был предложен вариант живой рекомбинантной вакцины против ротавируса на основе штамма БЦЖ. Для подбора условий экспрессии белка VP6 ротавируса в клетках БЦЖ были сконструированы челночные векторы *E. coli-Mycobacterium* с различными комбинациями элементов. Векторы являлись интегративными или эписомальными, содержали три различных конститутивных или индуцибельных промотора, контролирующих ген VP6, пять разных сайтов связывания рибосом и были нацелены на накопление белка в цитоплазме, на прикрепление его к плазматической мембране микобактерий или на выделение VP6 во внешнюю среду. Три интегративных и два эписомальных вектора с индуцибельными промоторами были стабильны и сохранялись в клетках БЦЖ. Наиболее высокая продукция VP6 наблюдалась в штаммах с двумя вышеупомянутыми эписомальными векторами (1,77% и 0,79%) [67].

Рекомбинантные штаммы БЦЖ, продуцирующие VP6, оценивали на мышинной модели на предмет иммуногенности и защитной эффективности. Один штамм БЦЖ с эписомальным и один с интегрированным вектором снижали выделение вируса у интраперитонеально вакцинированных мышей, зараженных ротавирусом. По сравнению с контрольной группой выделение

вируса с фекалиями, связанное с инфекцией, было снижено на 66% и 62% соответственно. Эти векторы различаются промотором, сайтом связывания рибосом и уровнем продукции антигена, но в обоих белок VP6 слит с сигнальной последовательностью липопротеина массой 19 кДа, заякоряющей VP6 на мембране микобактерий. Это позволяет предположить, что транспорт VP6 к мембране БЦЖ важен для индукции защитного иммунного ответа. Защита от ротавирусной инфекции возникала при отсутствии обнаружения антиротавирусных антител в сыворотке или кале, что предполагает участие клеточного иммунитета в защите [67].

Живые рекомбинантные вакцины на основе штаммов бактерий также использовались для пероральной иммунизации против антигенов ротавируса. Пероральная иммунизация мышей рекомбинантными штаммами *Salmonella enterica Typhimurium* или *Lactobacillus Lactis*, экспрессирующими VP7, вызывала иммунные ответы после введения, но об исследованиях заражения не сообщалось [68, 69].

Рекомбинантные вакцинные штаммы *Bacillus subtilis*, сконструированные для экспрессии белка VP6 бычьего или мышинового ротавируса группы А, были протестированы на взрослых мышах на их способность индуцировать иммунные ответы и обеспечивать защиту от заражения ротавирусом. Мышам интраназально прививали споры или вегетативные клетки рекомбинантных штаммов *B. subtilis*. Для повышения мукозального иммунитета в качестве адъювантов были добавлены либо цельный холерный токсин (СТ), либо мутантная форма (R192G) термолабильного токсина *E. coli* (mLT). Для оценки эффективности вакцины иммунизированным мышам перорально вводили мышинный ротавирус EDIM EW и ежедневно в течение 7 дней контролировали выделение вируса с фекалиями. Методом твердофазного ИФА установлено, что у мышей, иммунизированных либо споровыми, либо вегетативно-клеточными формами штаммов *B. subtilis*, экспрессирующих VP6, повышались титры сывороточных анти-VP6 IgG, тогда как фекальные титры анти-VP6 IgA генерировали только споровые вакцины. В группах мышей,

иммунизированных споровыми вакцинами с добавлением СТ или mLT, было показано значительное снижение выделения вируса, тогда как в группах мышей, иммунизированных вегетативно-клеточными вакцинами, не выявлено различий в выделении вируса по сравнению с мышами, иммунизированными контрольными спорами или клетками. Эти результаты демонстрируют, что интраназальная инокуляция ротавирусными вакцинами на основе спор *B. subtilis* эффективна для создания защитного иммунитета против заражения ротавирусом у мышей [70].

В настоящее время по всему миру ведутся разработки мРНК-вакцин против ротавирусной инфекции. Основной принцип действия таких вакцин состоит в следующем: мРНК, кодирующая антигены ротавируса, вводится парентерально, и белки ротавируса транслируются с неё в клетках реципиента. Одной из важнейших проблем при разработке мРНК-вакцин является выбор способа доставки мРНК в нужные клетки. В научной литературе сообщалось о побочных эффектах, которые могут быть связаны с применением мРНК-вакцин: аутоиммунитет, вызванный ответами IFN типа I; отек и коагуляция из-за избыточной внеклеточной РНК и индукции антител против мРНК; побочные эффекты, связанные с векторами или путями введения [71].

Международная группа учёных разработала два варианта генетических конструкций, входящих в состав мРНК вакцины против ротавируса. Первая конструкция состояла из мРНК, кодирующей универсальный Т-клеточный эпитоп Р2 столбнячного анатоксина и белок VP8\* ротавируса (P2-VP8); вторая (LS-P2-VP8\*) помимо вышеперечисленных компонентов включала в себя ген люминисинтазы (LS), белка, необходимого для формирования наночастиц. В экспериментах задействованы как моновалентные, так и трёхвалентные вакцины (генотипы P[4], P[6], P[8]). Согласно данным криоэлектронной микроскопии и вестерн-блоттинга, белки, полученные из мРНК LS-P2-VP8\*, секретируются *in vitro* и самоорганизуются в 60-мерные наночастицы, отображающие на своей поверхности VP8\*. VP8\*, транслируемый с мРНК, был иммуногенным у грызунов и вызывал как гуморальный, так и клеточный

ответ. LS-P2-VP8\* индуцировал значительные гуморальные реакции на P2-VP8\* у морских свинок, как в виде моновалентных, так и трехвалентных вакцин. В целом, данные, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о том, что трехвалентная LS-P2-VP8\* представляет собой перспективный кандидат на ротавирусную вакцину следующего поколения на основе мРНК [72].

Группой исследователей из Китая была разработана нуклеозидно-модифицированная мРНК-вакцина против ротавирусной инфекции. К РНК, кодирующей VP7 ротавируса генотипа G1, были добавлены нетранслируемые регионы (5'-нетранслируемый регион ротавируса и 3'-нетранслируемый регион человеческого  $\beta$ -глобина) и поли-А хвост. Получившаяся последовательность была амплифицирована в составе плазмиды pUC57-Kan-SapI-free путём транскрипции *in vitro* под контролем промотора T7, кэпирована и очищена с использованием магнитных бусин. Для доставки молекул мРНК VP7 в клетки были сформированы липидные наночастицы, внутри которых находились мРНК. Исследование эффективности трансфекции липидных наночастиц и экспрессии белка VP7 проводилось с использованием клеточной линии HEK293; эффективность была подтверждена методами электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга [73].

Исследования иммуногенности мРНК-вакцины проводились на мышах линии Balb/c. Вакцину вводили мышам подкожно или внутримышечно, с добавлением гидроксида алюминия в качестве адъюванта или без добавления адъюванта. Мыши подвергались трём инъекциям с интервалом в 21 день. Оценивали антитела IgG, нейтрализующие антитела, клеточный иммунитет и экспрессию генов мононуклеарных клеток периферической крови. Значительные различия в уровнях антител IgG не наблюдались в группах с адъювантом, но наблюдались в группах без адъюванта. Вакцина без адъюванта вызывала самые высокие титры антител после внутримышечной инъекции. Вакцина вызвала мощный противовирусный иммунный ответ,

характеризующийся наличием противовирусных кластеров дифференцированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. мРНК-вакцина VP7 индуцировала секрецию интерферона- $\gamma$ , опосредуя клеточный иммунный ответ. Опосредованные хемокинами сигнальные пути и иммунный ответ активировались инъекцией мРНК-вакцины VP7. На данный момент исследований защитной эффективности вакцины не проводилось [73].

Для оценки безопасности вакцины после иммунизации проводили мониторинг массы тела мышей. Вес мышей измеряли один раз в неделю. Масса тела мышей в каждой группе существенно не снижалась и сохраняла стабильный рост. Результаты показали, что мыши нормально росли во время иммунизации. Иммунизация мышей вакциной не повлияла на массу тела, что указывает на отсутствие серьезных побочных эффектов у вакцины [73].

Россия относится к регионам с высокой заболеваемостью острым гастроэнтеритом (ОГЭ): ежегодно регистрируется около 700 тыс. случаев. Около 60% всех случаев ОГЭ составляют кишечные инфекции неизвестной этиологии. Наибольшая доля всех случаев ОГЭ с установленной этиологией связана с ротавирусной инфекцией — от 50 до 72% [74].

В Российской Федерации зарегистрирована вакцина RotaTeq. В 2014 году она внесена в национальный календарь прививок (по эпидемическим показаниям) и в региональные календари прививок нескольких субъектов. Также зарегистрирована (лицензирована) индийская Rota-V-Эйд – вариант RotaSiil™.

Вакцинация против ротавируса в РФ не получила широкого распространения: охват целевой когорты составляет от 1 до 2% [75]. Распространённость ротавирусной инфекции среди детей в России показывает необходимость расширения разработок отечественных вакцин против ротавирусной инфекции, основанных на современных молекулярных технологиях.

### Список литературы

1. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J. Virus particles in the epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. // *Lancet*. – 1973. – V. 2. – P. 1281–1283.
2. Research priorities for diarrhoeal disease vaccines: memorandum from a WHO meeting // *Bull World Health Organ*. – 1991. – V. 69(6). – P. 667–76.
3. Идеи Пастера в борьбе с инфекциями // Международный симп., посв. году Пастера. – 1995. – С.-Петербург. – С. 146–146.
4. Black R., Fontaine O., Lamberti L., et al. Drivers of the reduction in childhood diarrhea mortality 1980-2015 and interventions to eliminate preventable diarrhea deaths by 2030 // *J Glob Health*. – 2019. – V. 9(2). – P. 020801. doi: 10.7189/jogh.09.020801.
5. Ward R.L., McNeal M.M., Steele A.D. Why does the world need another rotavirus vaccine? // *Ther Clin Risk Manag*. – 2008. – V. 4(1). – P. 49–63. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s821>
6. Tate J.E., Parashar U.D. Rotavirus vaccines in routine use // *Clin Infect Dis*. – 2014. – V. 59. – P. 1291–1301.
7. Nordgren J., Sharma S., Bucardo F., et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner // *Clin Infect Dis*. – 2014. – V. 59. – P. 1567–73.
8. Srivastava V., Deblais L., Huang H-C., et al. Reduced rotavirus vaccine efficacy in protein malnourished human-faecal-microbiota-transplanted gnotobiotic pig model is in part attributed to the gut microbiota // *Benef Microbes*. – 2020. – V. 11(8). – P. 733–751.
9. Watanabe K., Petri, Jr W.A. Environmental Enteropathy: Elusive but Significant Subclinical Abnormalities in Developing Countries // *EBioMedicine*. – 2016. V. 10. – P. 25–32.

10. Moon S.S., Wang Y., Shane A.L., et al. Inhibitory effect of breast milk on infectivity of live oral rotavirus vaccines // *Pediatr Infect Dis J.* – 2010. – V. 29. – P. 919–923.
11. Faden H., Schaefer B.A. Secretors of HBGA and Susceptibility to Norovirus and Rotavirus Diarrhea // *Pediatr Infect Dis J.* – 2021. – V. 40(9). – P. 846–851.
12. Song J.M. Parenteral, non-live rotavirus vaccine: recent history and future perspective // *Clin Exp Vaccine Res.* – 2021. – V. 10 (3). – P. 203–210.
13. Reddy S.N., Nair N.P., Tate J.E., et al. Intussusception after Rotavirus Vaccine Introduction in India // *N Engl J Med.* – 2020. – V. 383. – P. 1932–1940.
14. Carvalho M.F. and Gill D. Rotavirus vaccine efficacy: current status and areas for improvement // *Human vaccines & immunotherapeutics.* – 2019. – V. 15 (6). – P. 1237–1250.
15. Kirkwood C.D., Ma Lyou-Fu, Carey M.E., Steele A.D. The rotavirus vaccine development pipeline // *Vaccine.* – 2019. – V. 37. – P. 7328–7335.
16. Santos V.S., Marques D.P., Martins-Filho P.R., et al. Effectiveness of rotavirus vaccines against rotavirus infection and hospitalization in latin America: systematic review and meta-analysis // *Infect Dis Poverty.* – 2016. – V. 5 (83). – s40249-016-0173-2.
17. Armah G., Pringle K., Enweronu-Laryea C.C., et al. Impact and effectiveness of monovalent rotavirus vaccine against severe rotavirus diarrhea in Ghana // *Clin Infect Dis.* – 2016. – V. 62. – P. 200–207.
18. Le L.T., Nguyen T.V., Nguyen P.M., et al. Development and characterization of candidate rotavirus vaccine strains derived from children with diarrhea in Vietnam // *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – P. 130–138.
19. Das B.K., Genstch J.R., Cicerello H.G., et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India // *J Clin Microbiol.* – 1993. – V. 32. – P. 1820–1822.

20. Skansberg A., Sauera M., Tan M., et al. Product review of the rotavirus vaccines ROTASIIL, ROTAVAC, and Rotavin-M1 // *Human vaccines & immunotherapeutics*. – 2021. – V. 17 (4). – P. 1223–1234.
21. Bai Z.S., Chen D.M., Shen S. Selection and characterization of strain LLR-85 for oral live rotavirus vaccine. *Chin J Biol*. – 1994. – V. 7. – P. 49–52.
22. Li J., Zhang Y., Yang Y., et al. Effectiveness of Lanzhou lamb rotavirus vaccine in preventing gastroenteritis among children younger than 5 years of age // *Vaccine*. – 2019. – V. 37. – P. 3611–3616.
23. Xia S., Du J., Su J., et al. Efficacy, immunogenicity and safety of a trivalent live human-lamb reassortant rotavirus vaccine (LLR3) in healthy Chinese infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Vaccine*. – 2020. – V. 38. – P. 7393–7400.
24. Hoshino Y., Jones R.W., Chanock R.M., Kapikian A.Z. Construction of four double gene substitution human x bovine rotavirus reassortant vaccine candidates: each bears two outer capsid human rotavirus genes, one encoding P serotype 1A and the other encoding G serotype 1, 2, 3, or 4 specificity // *J Med Virol*. – 1997. – V. 51(4). – P. 319–325.
25. Clements-Mann M.L., Dudas R., Hoshino Y., et al. Safety and immunogenicity of live attenuated quadrivalent humanbovine (UK) reassortant rotavirus vaccine administered with childhood vaccines to infants // *Vaccine*. – 2001. – V. 19. – P. 4676–84.
26. Kapikian A.Z., Simonsen L., Vesikari T., et al. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception // *J Infect Dis*. – 2005. – V. 192. – P. 22–29.
27. Vetter V., Gardner R.C., Debrus S., et al. Established and new rotavirus vaccines: a comprehensive review for healthcare professionals // *Human vaccines & immunotherapeutics*. – 2022. – V. 18 (1). – e1870395.

28. Danchin M.H., Kirkwood C.D., Lee K.J., et al. Phase I trial of RV3-BB rotavirus vaccine: a human neonatal rotavirus vaccine // *Vaccine*. – 2013. – V. 31. – P. 2610–2616.
29. Bishop R.F., Barnes G.L., Cipriani E., Lund J.S. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children // *N Engl J Med*. – 1983. – V. 309. – P. 72–76.
30. Bányai K., László B., Duque J., et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs // *Vaccine*. – 2012. – V. 30. – P. 122–130.
31. Conner M.E., Crawford S.E., Barone C., Estes M.K. Rotavirus vaccine administered parenterally induces protective immunity // *J Virol*. – 1993. – V. 67. – P. 6633–6641.
32. Yuan L., Kang S.Y., Ward L.A., et al. Antibody-secreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus // *J Virol*. – 1998. – V. 72. – P. 330–338.
33. Chen W.K., Campbell T., VanCott J., Saif L.J. Enumeration of isotype-specific antibody-secreting cells derived from gnotobiotic piglets inoculated with porcine rotaviruses // *Vet Immunol Immunopathol*. – 1995. – V. 45. – P. 265–284.
34. McNeal M.M., Rae M.N., Conner M.E., Ward R.L. Stimulation of local immunity and protection in mice by intramuscular immunization with triple-or double-layered rotavirus particles and QS-21 // *Virology*. – 1998. – V. 243. P. – 158–166.
35. Shahrudin S., Chen C., David S.C., et al. Gamma-irradiated rotavirus: A possible whole virus inactivated vaccine // *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – e0198182.
36. Jiang B., Wang Y., Saluzzo J.F., et al. Immunogenicity of a thermally inactivated rotavirus vaccine in mice // *Hum Vaccin*. – 2008. – V. 4. – P. – 143–147.

37. Esona M.D., Foytich K., Wang Y., et al. Molecular characterization of human rotavirus vaccine strain CDC-9 during sequential passages in Vero cells // *Hum Vaccin.* – 2010. – V. 6. – P. 10409.
38. Jiang B., Wang Y., Glass R.I. Does a monovalent inactivated rotavirus vaccine induce heterotypic immunity? Evidence from animal studies // *Human Vaccine Immunother.* – 2013. – V. 9. – P. 1634–1637.
39. Wen X., Cao D., Jones R.W., et al. Construction and characterization of human rotavirus recombinant VP8 subunit parenteral vaccine candidates // *Vaccine.* – 2012. – V. 30. – P. 6121–6126.
40. Fix A.D., Harro C., McNeal M., et al. Safety and immunogenicity of a parenterally administered rotavirus VP8 subunit vaccine in healthy adults // *Vaccine.* – 2015. – V. 33. – P. 3766–3772.
41. Groome M.J., Fairlie L., Morrison J., et al. Safety and immunogenicity of a parenteral trivalent P2-VP8 subunit rotavirus vaccine: a multisite, randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet Infect Dis.* – 2020. – V. 20. – P. 851–863.
42. Ward R.L., McNeal M.M. VP6: a candidate rotavirus vaccine // *J Infect Dis.* – 2010. – V. 202. – P. 101–107.
43. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 // *Медицинская иммунология.* – 2016. – Т. 18 (5). – С. 417-424.
44. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // *Инфекция и иммунитет.* – 2014. – Т. 4 (3). – С. 229–234.
45. O'Neal C.M., Crawford S.E., Estes M.K., Conner M.E. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity // *J Virol.* – 1997. – V. 71. – P. 8707–8717.

46. Yuan L., Geyer A., Hodgins D.C., et al. Intranasal administration of 2/6-rotavirus-like particles with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT-R192G) induces antibody-secreting cell responses but not protective immunity in gnotobiotic pigs // *J Virol.* – 2000. – V. 74. – P. 8843–8853.
47. Kurokawa N., Lavoie P.O., D'Aoust M.A., et al. Development and characterization of a plant-derived rotavirus-like particle vaccine // *Vaccine.* – 2021. – V. 39. – P. 4979–4987.
48. Kurokawa N., Robinson M.K., Catherine Bernard C., et al. Safety and immunogenicity of a plant-derived rotavirus-like particle vaccine in adults, toddlers and infants // *Vaccine* 39 (2021) 5513–5523.
49. Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южаков А.Г. и др. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus А) человека // *Вопросы вирусологии.* – 2021. – Т. 66 (1). – С. 55–64.
50. Костина Л.В., Филатов И.Е., Елисеева О.В. и др. Исследование безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции на модели новорожденных карликовых свиней // *Вопросы вирусологии.* – 2023. – Т. 68 (5). – С. 415 – 427.
51. Cheuvart B., Neuzil K.M., Steele A.D., et al. Association of serum anti-rotavirus immunoglobulin A antibody seropositivity and protection against severe rotavirus gastroenteritis: analysis of clinical trials of human rotavirus vaccine // *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10. – P. 505–511.
52. Patel M., Glass R.I., Jiang B., et al. Systematic review of anti-rotavirus serum IgA antibody titer as a potential correlate of rotavirus vaccine efficacy // *J Infect Dis.* – 2013. – V. 208. – P. 284–294.
53. Pastor A.R., Rodriguez-Limas W.A., Contreras M.A., et al. The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice // *Vaccine.* – 2014. – V. 32. – P. 2874–2877.

54. Blazevic V., Lappalainen S., Nurminen K., et al. Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis // *Vaccine*. – 2011. – V. 29. – P. 8126–8133.
55. Heinimäki S., Hankaniemi M.M., Sioofy-Khojine A.B., et al. Combination of three virus-derived nanoparticles as a vaccine against enteric pathogens; enterovirus, norovirus and rotavirus // *Vaccine*. – 2019. – V. 37. – P. 7509–7518.
56. Heinimäki S., Tamminen K., Hytonen V.P., et al. Rotavirus inner capsid VP6 acts as an adjuvant in formulations with particulate antigens only // *Vaccines (Basel)*. – 2020. – V. 8. – P. 365.
57. Lappalainen S., Pastor A.R., Malm M., et al. Protection against live rotavirus challenge in mice induced by parenteral and mucosal delivery of VP6 subunit rotavirus vaccine // *Arch Virol*. – 2015. – V. 160. – P. 2075–2078.
58. Tan M., Jiang X. Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus // *Nanomedicine (Lond)*. – 2012. – V. 7. – P. 889–897.
59. Tan M., Huang P., Xia M., et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production // *J Virol*. – 2011. – V. 85. – P. 753–764.
60. Ramesh A., Mao J., Lei S., et al. Parenterally administered P24-VP8\* nanoparticle vaccine conferred strong protection against rotavirus diarrhea and virus shedding in gnotobiotic pigs // *Vaccines (Basel)*. – 2019. – V. 7. – P. 177.
61. Xia M., Huang P., Sun C., et al. Bioengineered norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform // *ACS Nano*. – 2018. – V. 12. – P. 10665–10682.
62. Xia M., Huang P., Jiang X., Tan M. Immune response and protective efficacy of the S particle presented rotavirus VP8\* vaccine in mice // *Vaccine*. – 2019. – V. 37. – P. 4103–4110.

63. Li Z., Cui K., Wang H., et al. A milk-based self-assemble rotavirus VP6-ferritin nanoparticle vaccine elicited protection against the viral infection // *J Nanobiotechnology*. – 2019. – V. 17. – P. 13.
64. Рябчевская Е.М., Евтушенко Е.А., Архипенко М.В. и др. Новый подход к разработке кандидатной вакцины против ротавируса на основе двух вирусов растений // *Сельскохозяйственная биология*. – 2020. – Т. 55 (5). – С. 1004–1017.
65. Laimbacher A.S., Esteban L.E., Castello A.A., et al. HSV-1 Amplicon Vectors Launch the Production of Heterologous Rotavirus-like Particles and Induce Rotavirus-specific Immune Responses in Mice // *Molecular Therapy*. – 2012. – V. 20 (9). – P. 1810–1820.
66. Xie L., Yan M., Wang X., et al. Immunogenicity and efficacy in mice of an adenovirus-based bicistronic rotavirus vaccine expressing NSP4 and VP7 // *Virus Res*. – 2015. – V. 210 (2). – P. 298–307.
67. Dennehy M., Bourn W., Steele D., Williamson A.L. Evaluation of recombinant BCG expressing rotavirus VP6 as an anti-rotavirus vaccine // *Vaccine*. – 2007. – V 25 (18). – P. 4. 3646–3657.
68. Perez C. A., Eichwald C., Burrone O., Mendoza D. Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – V. 99. – P. 1158–1164.
69. Wang L., Huang J.A., Nagesha H.S., et al. Bacterial expression of the major antigenic regions of porcine rotavirus VP7 induces a neutralizing immune response in mice // *Vaccine*. – 1999. – V. 17. – P. 2636–2645.
70. Lee S., Belitsky B.R., Brinker J.P., et al. Development of a *Bacillus subtilis*-Based Rotavirus Vaccine // *Clin Vaccine Immunol.* – 2010. – V. 17(11). – P. 1647–1655.
71. Xu S., Yang K., Li R., Zhang L. mRNA Vaccine Era-Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21(18). 6582. doi: 10.3390/ijms21186582.

72. Roier S., Mangala Prasad V., McNeal M.M., et al. mRNA-based VP8\* nanoparticle vaccines against rotavirus are highly immunogenic in rodents // *NPIJ Vaccines*. – 2023. – V. 8(1). – 190. doi: 10.1038/s41541-023-00790-z.

73. Lu C., Li Y., Chen R., et al. Safety, Immunogenicity, and Mechanism of a Rotavirus mRNA-LNP Vaccine in Mice // *Viruses*. – 2024. – V. 16(2). 211. doi: 10.3390/v16020211.

74. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году. Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2024. – 364 с.

75. Коровкин А.С., Игнатьев Г.М. Результаты и перспективы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции в Российской Федерации // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2023. – Т. 23(4). – С. 499–512. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-499-512>

## РАЗРАБОТКА НОРОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Норовирус был идентифицирован в 1972 году и вскоре было обнаружено, что он является одной из наиболее распространенных причин вспышек острого гастроэнтерита и спорадических эпизодов острой диареи у лиц разного возраста [1]. Норовирусная инфекция вызывает огромные медицинские, социальные и экономические проблемы, что определило необходимость разработки адекватных профилактических мер против этой инфекции. Однако разработка вакцины для профилактики норовирусной инфекции долгое время осложнялась из-за отсутствия адекватных клеточных линий для культивирования вируса и модельных животных для оценки свойств вакцины. Тем не менее, необходимость в эффективной антиноровирусной вакцине особо подчеркивалась Всемирной организацией здравоохранения, которая заявила в 2016 году, что разработка вакцины против норовирусной инфекции должна рассматриваться в качестве абсолютного приоритета [2]. Разработка эффективных ротавирусных вакцин и их включение в национальные календари иммунизации детей сделали эпидемиологическую значимость норовируса еще более актуальной [3].

Норовирус, наряду с ротавирусом, является наиболее распространенным этиологическим агентом острого гастроэнтерита во всем мире. Среди 2,7–4 миллиардов случаев диареи, которые ежегодно диагностируются в мире, примерно 18% связаны с норовирусной инфекцией. Существенных различий между развитыми (20%) и развивающимися странами с низкой смертностью, связанной с диареей (19%), не обнаруживается [4-6]. Исследования, проведенные в некоторых развитых странах, показали, что от 3,8 до 10,4% населения ежегодно поражается норовирусом, что позволяет предположить, что в течение жизни каждый человек может страдать от норовирусной диареи от 3 до 8 раз [7-12]. Однако частота заболевания выше у детей младшего возраста и у взрослых старше 65 лет. Множество исследователей сообщают, что дети до 5 лет намного чаще болеют норовирусным гастроэнтеритом, а у

взрослых старше 65 лет норовирусная инфекция встречается в два раза чаще, чем у лиц в возрасте 15-64 лет. Этот факт подчеркивает, что лица с физиологически сниженными защитными силами, то есть дети и пожилые люди, лица с хроническими заболеваниями нуждаются в эффективной специфической профилактике норовирусной инфекции [13]. При этом зарегистрированные в мире случаи инфицирования норовирусом и частота норовирусного гастроэнтерита значительно занижены вследствие недоступности адекватных методов диагностики в странах с низким уровнем доходов. С другой стороны, даже в исследованиях, специально посвященных анализу эпидемиологии норовирусной инфекции, бессимптомные случаи могут быть выявлены только при систематическом периодическом исследовании стула. Инфицирование вирусом может оставаться бессимптомным в 20-30% случаев или приводить к легкой форме заболевания, самопроизвольно разрешаясь через 2-3 дня у большинства пациентов [14-15]. Заражение норовирусом является причиной 10-20% и 1-15% обращений в отделения неотложной помощи и госпитализаций в странах со средним/высоким уровнем дохода и в странах с низким уровнем дохода, соответственно. Более 3% пациентов с диареей умирают. Соответственно велики экономические и социальные потери, вызванные распространением норовирусной инфекции.

Норовирус чрезвычайно контагиозен, и передача инфекции от человека к человеку происходит легко, и ее трудно прервать при отсутствии эффективных профилактических мер. Рвотные массы и кал инфицированных субъектов содержат большое количество вирионов, тогда как для возникновения острого гастроэнтерита требуется всего 10 инфекционных частиц. Более того, норовирус обладает высокой устойчивостью к воздействию окружающей среды, и выделение после заражения обычно длится недели. Передача инфекции, как правило, происходит непосредственно от человека к человеку фекально-оральным и рвотно-оральным путями. Дети являются наиболее важным источником передачи

инфекции в семьях и школах. Вспышки могут возникать в медицинских учреждениях, включая дома престарелых и больницы и иметь серьезные последствия, особенно когда речь идет о детях младшего возраста, пожилых пациентах и лицах с ослабленным иммунитетом [16-17]. Генетический анализ всего генома или отдельных генов вируса привел к идентификации нескольких геногрупп норовируса. Более того, исследование последовательностей, кодирующих капсидный белок VP1 и РНК-зависимую РНК-полимеразу, показало, что в каждую геногруппу включено несколько генотипов. В настоящее время идентифицировано более 30 генотипов. Для человека характерны геногруппы I (GI), II (GII) и IV (GIV) [18]. Однако штамм GII является преобладающим во всем мире. Анализ 16 635 последовательностей образцов норовируса, собранных в период с 2005 по 2016 год в Европе, Азии, Океании и Африке в ходе расследований вспышек и спорадических возрастных случаев, показал, что 91,7% относятся к генотипу GII, 8,2% - к GI и <0,1% - к GIV [19]. Геногруппы отличаются высоким генетическим разнообразием. Более того, генотипы, включенные в одну геногруппу, могут иметь небольшие, но важные различия в антигенных характеристиках. Наконец, в отдельных генотипах часто могут наблюдаться точечные мутации и рекомбинации, которые продуцируют антигенно различные варианты [20].

Все вышеупомянутые факторы объясняют как трудности с поиском эффективной универсальной вакцины, так и частые вспышки, вызванные одним и тем же генотипом. Указанная проблема была четко продемонстрирована на примере норовируса генотипа GII.4 - наиболее частой причины вспышек острого гастроэнтерита. С 1990-х годов каждые 2-3 года появлялся новый вариант GII.4, вызывающий по меньшей мере эпидемии в разных географических районах [21-22]. Вирусы других генотипов также могут вызывать эпидемии. Среди сравнительно недавно выявленных наиболее распространенными являются вирусы, появившиеся в результате рекомбинации, такие как GII.P16-GII.4 Sidney, GII.P16-GII.2, GII.P4 Новый

Орлеан-GII.4 Сидней, GII.P12-GII.3 и GI.P6-GI6. Все они были связаны с крупными вспышками в США, Азии и Европе [23-24]. У лиц, инфицированных одним генотипом, нередко не вырабатывается ответ на другой генотип. В связи с этим в разрабатываемых в настоящее время вакцины включают несколько генотипов. Защита длится несколько лет, но, по-видимому, недолго [25-26]. Однако точно не определено, как долго длится эффективная защита; существуют ли различия между взрослыми и детьми, особенно самыми маленькими; и играет ли роль антигенный дрейф, как в случае с вирусом гриппа, снижающий защиту, вызванную предыдущими инфекциями с тем же генотипом.

До настоящего времени не обнаружен иммунный маркер, способный указать, защищен ли человек от инфекции и связанных с ней заболеваний, или нет. Обсуждалось использование общего уровня сывороточных антител, специфичных к норовирусу. Обычно при инфицировании уровень антиноровирусных антител имеет тенденцию к увеличению [27], в эпидемиологическом исследовании лица с титрами антител к норовирусу выше 1:4 болели норовирусной инфекцией реже в три раза в сравнении с лицами с титром менее 1:4 [28]. Однако, в другом исследовании уровни антител до заражения не были связаны с защитой от инфекции [29].

Недавно показано, что 20-30% населения в целом устойчивы к норовирусной инфекции. Устойчивость зависит от генотипа и даже штамма и обусловлена антигенами гистогруппы крови человека (HBGA), в основном теми, которые кодируются генами FUT2 (секреторные), FUT3 (Льюис) и ABO. Эти антигены являются кофакторами прикрепления норовируса и необходимы для его проникновения в поверхностные эпителиальные клетки. Мутации генов FUT2, FUT3 или ABO приводят к неспособности вируса проявлять свою вирулентность. FUT2 является наиболее изученным геном, и было идентифицировано несколько полиморфизмов с известными эффектами на

секреторный статус, многие из которых являются популяционно-специфичными. Как правило, люди с отсутствием или слабым присутствием фермента FUT2 частично или полностью устойчивы к норовирусу генотипов GI.1 и GII.4. При этом они могут оставаться восприимчивыми к инфекции, вызванной вирусами других генотипов [30]. Выявлены другие факторы, обуславливающие защиту от инфекции. При блокаде сывороточными антителами НВGA частота вирусного инфицирования была ниже, чем обычно. Частота инфицирования также была ниже у лиц с высокими сывороточными титрами специфических антител класса IgA [31]. Другими маркерами защиты могут быть норовирус-специфические IgA в слюне и кале и норовирус-специфические IgG-клетки памяти. В ходе исследования было обнаружено, что уровни специфичного для норовируса IgA в слюне до заражения норовирусом обратно коррелировали с тяжестью острого гастроэнтерита. Уровни специфичного для норовируса IgA в фекалиях до заражения коррелировали со снижением пиковой вирусной нагрузки и, при измерении через 7 дней после заражения, с сокращением продолжительности выделения вируса. Наконец, увеличение количества норовирус-специфичных IgG клеток памяти было связано с защитой от острого гастроэнтерита [32].

Разработано три типа кандидатных вакцин для профилактики норовирусной инфекции. Они основаны на использовании нереплицирующиеся вирусоподобных частиц (VLP), Р-частиц и рекомбинантных аденовирусов. Все предложенные платформы имеют свои минусы и плюсы. Вирусоподобные частицы представляют собой структуры, которые имитируют организацию и конформацию аутентичных нативных вирусов, но лишены вирусного генома, что потенциально позволяет получить более безопасные и дешевые вакцины-кандидаты. В случае норовируса вакцины получают из основного капсидного белка VP1, который спонтанно самоорганизуется в VLP. VLP антигенно подобны вирусной частице и способны вызывать специфическую реакцию антител при введении как

энтеральным, так и парентеральным путями без какого-либо риска заражения. VLP получены в бакуловирусной системе репликации и системе репликации венесуэльского энцефалита лошадей [33-35]. Обе вакцины относительно недороги. Однако трудно удаляются сопутствующие контаминанты, что осложняет очистку. Р-частицы представляют собой наночастицы, образованные копиями выступающего (Р) домена капсидного белка VP1. Они содержат все необходимые элементы для взаимодействия с вирусными рецепторами, обладают высокой иммуногенностью и активируют как врожденную, так и адаптивную иммунную систему, вызывая гуморальный и клеточный иммунитет. Более того, они стабильны и могут легко нарабатываться в *E. coli*. Поэтому они считаются потенциально эффективными кандидатами на вакцину. Однако, в отличие от Р-частиц VLP могут индуцировать более эффективный перекрестный иммунный ответ Т-хелперов типа 1 (Th1) и Th2 по сравнению с Р-частицами, что делает VLP более удобными для получения новых вакцин. Наконец, были предприняты попытки использовать рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий норовирусный белок VP1 генотипов GI1 или GII4 [36-38].

Независимо от выбора платформы для разработки иммуногенной и протективной вакцины, важным является вопрос, связанный с антигенным составом вакцины, то есть вопрос о генотипах, которые должны быть включены в состав вакцины. Первоначально, учитывая, что первым обнаруженным норовирусом был штамм генотипа GI.1, была разработана кандидатная вакцина, содержащая этот вирус. Позже, когда было показано, что GII.4 является наиболее частой причиной заболевания и что уровень перекрестной реактогенности между GI.1 и GII.4 очень низок, был разработан прототип комбинированной вакцины, включающий оба генотипа. Затем были предложены более сложные вакцины, содержащие дополнительные штаммы или Р-частицы, а также вирусные векторы.

Получена интраназальная вакцина, содержащая VLP GI.1, а также адъювант в виде монофосфориллипида А (MPL). Показано, что она индуцирует вирусспецифические сывороточные антитела у большинства реципиентов вакцины. Более того, когда взрослые, получившие две дозы этой вакцины, были заражены вирусом, включенным в вакцину, риск развития норовирусной инфекции падал вдвое в сравнении с невакцинированными, но инфицированными лицами [47]. Дальнейшие исследования подтвердили иммуногенность этой вакцины, подчеркнув ее возможное использование в профилактике норовирусной инфекции. В частности, было показано, что иммунный ответ на вакцину у взрослых лиц зависел от дозы (100 мкг VLP или 50 мкг) [39]. Однако, поскольку инфицирование норовирусами других генотруппами предотвратить не удалось, дальнейшие исследования были направлены главным образом на подготовку комбинированной вакцины.

Наряду с интраназальными разработаны двухвалентные вакцины для внутримышечного введения, содержащие VLP генотипов GI.1 и GII.4. Сухая порошкообразная композиция (GelVac™) с *in situ* гелеобразующим полисахаридом (GelSite™), выделенным из *алоэ вера*, была протестирована на морских свинках для оценки безопасности, иммуногенности и потенциального антигенного воздействия при назальном введении. Было установлено, что препарат безопасен, хорошо переносится и способен вызывать дозозависимый иммунный ответ с выработкой антител, способных ингибировать связывание VLP с муцином желудка свиньи [40]. Учитывая, что внутримышечное введение может вызвать более быстрый ответ антител, чем внутривенная вакцина, была подготовлена и парентеральная вакцина. Она была разработана сотрудниками фирмы Takeda Pharmaceutical Company Limited и основана на VLP штамма Norwalk GI.1, который перекрестно реагирует с другими штаммами GI.1, и консенсусе из 3 штаммов генотруппы GII [2006a (Йерсеке), 2006b (Ден Хааг) и 2002 (Хьюстон)] для максимального повышения защиты от штаммов GII [41]. Доклинические исследования показали, что эта вакцина

обладает высокой иммуногенностью, и что индуцированные ею антитела способны распознавать не только гомологичные, но и гетерологичные генотипы и реагировать на них. К таким генотипам относятся генотипы GI.3, GII.1, GII.3 и GIV.1 [42]. Использование этого прототипа двухвалентной вакцины с добавлением MPL и гидроксида алюминия у взрослых в возрасте 18-83 лет в двух исследованиях фазы I подтвердило иммуногенность двухвалентной вакцины [43-44]. Добровольцам были введены две дозы с интервалом в месяц. Титр антител против GI.1 и GII.4 быстро увеличивался и достигал максимального уровня примерно через 7 дней после первой инъекции. Частота серореактивности при введении первой дозы варьировала от 88 до 100% для антигена GI.1 и от 69 до 84% для антигена GII.4. Однако бустерный эффект второй дозы был невысоким, хотя у большинства добровольцев было отмечено значительное увеличение титров антител, блокирующих НВГА. На клиническую эффективность двухвалентной вакцины указывают данные, собранные в ходе двойного слепого плацебо-контролируемого исследования, в котором приняли участие взрослые в возрасте 18-50 лет. Они получали две дозы плацебо или двухвалентной вакцины с интервалом в 4 недели и были заражены штаммом вирусом GII.4, различающимся с включенными в вакцину. Мониторинг клинического состояния больных после заражения таким вирусом показал менее тяжелое, хотя статистически не достоверное, течение заболевания в сравнении с невакцинированными лицами [45].

Проведена II фаза клинических испытаний данной двухвалентной вакцины [46]. На 454 взрослых лицах оценена оптимальная доза каждого антигена для обеспечения наилучшего баланса переносимости и иммуногенности. Было обнаружено, что вакцина, содержащая 15 мкг VLP GI.1 и 50 мкг VLP GII.4, была более эффективной в сравнении с вакциной, содержащей одинаковые дозы VLP разных геногрупп. В обоих случаях иммунный ответ на вакцинацию был быстрым, достигая максимума на 7-10-й день и сохраняясь до 28-го дня.

В ходе дополнительного испытания [47], оценивались различные дозы антигенов и адъювантов. Две дозы вакцины вводились с интервалом в 28 дней. Результаты подтвердили, что комбинация 15 мкг VLP GI.1 и 50 мкг VLP GII.4 обеспечивала наилучший баланс иммуногенности, при этом титры антител сохранялись выше исходных значений в течение 1 года после введения. Были также сделаны заключения относительно эффективности использованных адъювантов. MPL был исключен из состава вакцины и кандидатом на дальнейшие исследования оставался препарат, содержащий 15 мкг VLP GI.1 и 50 мкг VLP GII.4, с добавлением только гидроксида алюминия в качестве адъюванта.

Вторая фаза испытания этой же двухвалентной вакцины была проведена также на детях разного возраста. Результаты показали эффективность вакцины. Самые высокие средние геометрические титры (GMTS) для GI.1 и GII.4 наблюдались после двух доз препарата 50 мкг/150 мкг [48]. Продолжаются испытания фазы II, касающиеся иммуногенности и безопасности при иммунизации лиц пожилого возраста (более 60 лет) (NCT02661490), эффективности у взрослых (NCT02669121) и долгосрочной иммуногенности у взрослых (NCT03039790).

Разработан прототип вакцины для интраназального применения на основе рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего GII.4 VP1. У мышей, вакцинированных таким вектором обнаружены специфические IgA и IgG в сыворотке крови, кале, слизистой оболочке кишечника и дыхательных путей [45]. Когда животные получали вакцинацию аденовирусным вектором в сочетании с бустерной вакцинацией VLPs норовируса, иммунный ответ повышался [58]. Исходя из представленных результатов фирма Vaxart Inc. разработала кандидатную пероральную моновалентную вакцину для профилактики GI.1 норовирусной инфекции, основанную на векторе аденовируса 5. После введения здоровым взрослым [49-50] было установлено,

что она безопасна и хорошо переносится, поскольку побочные эффекты были легкими или умеренными. Более того, она вызывала значительный иммунный ответ, специфичный для норовируса GI.1, хотя ответ был строго дозозависимым. Для усиления защиты, обеспечиваемой рекомбинантной аденовирусной вакциной, была подготовлена и протестирована вторая аналогичная вакцина, в которой аденовирус экспрессировал GII.4 VP1.

Для одновременной профилактики ротавирусной и норовирусной инфекций были разработаны вакцины, содержащие материал обоих вирусов. Компаниями Daiichi Sankyo Company Limited & UMN Pharma Inc., Япония [51] разработана вакцина, содержащая вирусоподобные частицы норовирусов генотипов GII.4-1999 и GI.3 и белок VP6 в олигомерной форме. Последний является консервативным белком ротавирусов группы А, которые вызывают 90% всех ротавирусных инфекций. Известно, что введение этого белка защищает животных от гомологичной и гетерологичной ротавирусной инфекции [52]. Кроме того, VP6 ротавируса при использовании совместно с норовирусными вирусоподобными частицами может действовать как адъювант, усиливая иммунный ответ на эти антигены. Продемонстрировано, что VP6 ротавируса в условиях *in vitro* повышает поглощение норовирусных вирусоподобных частиц антиген-представляющими клетками, их активацию и созревание [53].

Исследования, проведенные на животных моделях, показали, что данная трехвалентная вакцина может индуцировать высокие уровни специфических антител против норовирусов и ротавирусов с высокой авидностью (>50%). Кроме того, были обнаружены перекрестно реагирующие антитела против разных типов норовирусов и ротавирусов, а также продемонстрировано наличие Т-клеточного иммунного ответа. Повышающий иммунный ответ эффект VP6 был подтвержден при использовании VP6 ротавируса совместно с другими генотипами норовируса [54-55].

Ведутся разработки вакцины для профилактики норовирусной инфекции на основе Р частиц норовируса, образованных Р-доменом белка VP1 норовируса и также способным к сборке в вирусоподобные структуры [56]. Предложены комбинированные вакцины против ротавирусов, вируса гриппа, астровируса, основанные на использовании Р частиц норовируса. Так, показано, что введение белка VP8 в Р домен VP1 норовируса способно индуцировать потенциально защитные антитела против обоих вирусов у мышей. Аналогичные положительные результаты были обнаружены, когда ген гриппа М2е был введен в Р домен белка VP1 норовируса [57-58].

Разрабатывается комбинированная вакцина, эффективная как против норовируса, так и против энтеровирусов. Использование такой вакцины актуально в географических регионах, где обе инфекции чрезвычайно распространены, таких как Азиатско-Тихоокеанский регион. Был разработан прототип вакцины, содержащий вирусоподобные частицы, включающие участки белков норовируса геногруппы GII.4 и белки энтеровируса EV71. На мышцах такой прототип вызывал иммунный ответ и предотвращал инфицирование вирусом и ингибировал связывание вирусоподобных частиц с муцином [59]. Таким образом в мире ведутся активные работы по созданию вакцины для профилактики норовирусной инфекции, однако ни одна из них пока не используется для вакцинации населения.

### Список литературы

1. Dolin R. Norwalk agent-like particles associated with gastroenteritis in human beings // J Am Vet Med Assoc. – 1978. – Vol. 173/ - P.615–619.
2. Giersing B.K., Vekemans J., Nava S. et al. WHO product development for vaccines advisory committee. report from the world health organization's third product development for vaccines advisory committee (PDVAC)

- meeting, Geneva, 8-10th June (2016) // *Vaccine*. - 2019ю – Vol. 37. – P.7315–7327.
3. Puustinen L., Blazevic V., Salminen M. et al. Noroviruses as a major cause of acute gastroenteritis in children in Finland, 2009–2010 // *Scand J Infect Dis*. – 2011. – Vol. 43. – P. 804–808.
  4. Global Burden of Disease Study Collaborators Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013 // *Lancet*.- 2015. – Vol. 386. – P. 743–800.
  5. Fischer Walker C.L., Perin J., Aryee M.J. et al. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review // *BMC Public Health*. – 2012. – Vol. 12. – P. 220.
  6. Lozano R., Naghavi M., Foreman K. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study (2010) // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380. – P. 2095–128.
  7. Verhoef L., Koopmans M., Van Pelt W. et al. The estimated disease burden of norovirus in the Netherlands // *Epidemiol. Infect.* - 2013. – Vol. 141. P. 496–506.
  8. Phillips G., Tam C. C., Conti S. et al. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis // *Am. J. Epidemiol.* -2010. - Vol. 171. – P. 1014–22. 10.1093/aje/kwq021.
  9. Tam C.C., Rodrigues L.C., Viviani L. et al. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice // *Gut*. – 2012. – Vol. 61. - P. 69–77. 10.1136/gut.2011.238386.
  10. Thomas M.K., Murray R., Flockhart L. et al. Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified

- agents, circa. - 2006. - Foodborne Pathog. Dis. – 2013. – Vol. 10. – P. :639–48. 10.1089/fpd.2012.1389.
11. Hall A.J., Rosenthal M., Gregoricus N. et al. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004–2005 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1381–1388. 10.3201/eid1708.101533.
  12. Karsten C., Baumgarte S., Friedrich A.W. et al. Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany 2004 // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 28. – P. 935–43. 10.1007/s10096-009-0729-1.
  13. O'Brien S.J., Donaldson A.L., Iturriza-Gomara M., Tam C.C. Age-specific incidence rates for norovirus in the community and presenting to primary healthcare facilities in the United Kingdom // *J. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 213, Suppl. 1. - S15–18. 10.1093/infdis/jiv411.
  14. Qi R., Ye C., Chen C. et al. Norovirus prevention and the prevalence of asymptomatic norovirus infection in kindergartens and primary schools in Changzhou, China: Status of the knowledge, attitudes, behaviors, and requirements // *Am. J. Infect. Control.* – 2015. – Vol. 43. – P. 833–838.
  15. Marshall J.A., Hellard M.E., Sinclair M.I. Incidence and characteristics of endemic norwalk-like virus-associated gastroenteritis // *J. Med. Virol.* – 2003. – Vol. 69. – P. 568–578.
  16. Teunis P.F., Moe C.L., Liu P. Norwalk virus: how infectious is it? // *J. Med. Virol.* – 2008. – Vol. 80. – P. 1468–1476.
  17. Chong P.P., Atmar R.L. Norovirus in health care and implications for the immunocompromised host // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2019. – Vol. 32. – P. 348–55.
  18. Kroneman A., Vega E., Vennema H., et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping // *Arch. Virol.* – 2013. -Vol. 158. P. 2059–2068.
  19. van Beek J., de Graaf M., Al-Hello H. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet

- network. *Lancet Infect Dis.* (2018) 18:545–53. 10.1016/S1473-3099(18)30059-8.
20. Parra G.I., Squires R.B., Karangwa C.K. et al. Static and evolving norovirus genotypes: implications for epidemiology and immunity. *PLoS Pathog.* – 2017. – Vol. 13: e1006136.
21. Siebenga J.J., Vennema H., Renckens B. et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006 // *J. Virol.* - 2007. – Vol. 81. – P. 9932–9941.
22. Siebenga J.J., Vennema H., Zheng D.P. et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007 // *J. Infect. Dis.* – 2009. -Vol. 200. – P. 802–812.
23. van Beek J., de Graaf M., Al-Hello H. et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network // *Lancet Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 18. – P. 545–553.
24. Cannon J.L., Barclay L., Collins N.R. et al. Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the united states from 2013 to (2016). Demonstrated emergence of novel GII.4 recombinant viruses // *J. Clin. Microbiol.* – 2017. – Vol. 55. P. 2208–2221.
25. Parrino T.A., Schreiber D.S., Trier J.S. et al. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by norwalk agent // *N. Engl. J. Med.* – 1977. – Vol. 297. – P. 86–89.
26. O’Ryan M.L., Lucero Y., Prado V. et al. Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a chilean birth cohort // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 879–884.
27. Parrino T.A., Schreiber D.S., Trier J.S. et al. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by norwalk agent // *N. Engl. J. Med.* – 1977. – Vol. 297(2). – P. 86-89.
28. Ryder R.W., Singh N., Reeves W.C. et al. Evidence of immunity induced by naturally acquired rotavirus and norwalk virus infection on two remote panamanian islands // *J. Infect. Dis.* – 1985. – Vol. 151. – P. 99–105.

29. Johnson P.C., Mathewson J.J., DuPont H.L., Greenberg H.B. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults // *J. Infect. Dis.* – 1990. – Vol. 161. P. 18–21.
30. Nordgren J., Svensson L. Genetic susceptibility to human norovirus infection: an update // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. P. 226.
31. Atmar R.L., Bernstein D.I., Lyon G.M. et al. Serological correlates of protection against a GII.4 norovirus // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2015. – Vol. 22. – P. 923–929.
32. Ramani S., Neill F.H., Opekun A.R. et al. Mucosal and cellular immune responses to norwalk virus. *J Infect Dis.* (2015) 212:397–405. 10.1093/infdis/jiv053.
33. Richardson C., Bargatze R.F., Goodwin R., Mendelman P.M. Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis // *Expert Rev. Vaccines.* – 2013. – Vol. 12. – P. 155–167.
34. Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the norwalk virus capsid protein // *J. Virol.* – 1992. – Vol. 66. – P. 6527–632.
35. Baric R.S., Yount B., Lindesmith L. et al. Expression and self-assembly of norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76. - P. 3023–3030.
36. Fang H., Tan M., Xia M., Wang L., Jiang X. Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity // *PLoS ONE.* - 2013. – Vol. 8: e63269.
37. Guo L., Wang J., Zhou H. et al. Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. *Vaccine.* (2008) 26:460–8. 10.1016/j.vaccine.2007.11.039 46.
38. Cortes-Penfield N.W., Ramani S., Estes M.K., Atmar R.L. Prospects and challenges in the development of a norovirus vaccine // *Clin. Ther.* – 2017. – Vol. 39. – P. 1537–1549.

39. Ramirez K., Wahid R., Richardson C. et al. Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers // *Clin. Immunol.* - 2012. – Vol. 144. - P. 98–108.
40. Ball J.P., Springer M.J., Ni Y. et al. Intranasal delivery of a bivalent norovirus vaccine formulated in an *in situ* gelling dry powder // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12: e0177310.
41. Lindesmith L.C., Donaldson E., Leon J. et al. Heterotypic humoral and cellular immune responses following norwalk virus infection // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 1800–1815.
42. Parra G.I., Bok K., Taylor R. et al. Immunogenicity and specificity of norovirus consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30. – P. 3580–3586.
43. Treanor J.J., Atmar R.L., Frey S.E. et al. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate—reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults // *J. Infect. Dis.* - 2014. – Vol. 210. – P. 1763–1771.
44. Sundararajan A., Sangster M.Y., Frey S. et al. Robust mucosal-homing antibody-secreting B cell responses induced by intramuscular administration of adjuvanted bivalent human norovirus-like particle vaccine // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33. – P. 568–576.
45. Bernstein D.I., Atmar R.L., Lyon G.M. et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J Infect Dis.* (2015) 211:870–8. [10.1093/infdis/jiu497](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu497).
46. Atmar R.L., Baehner F., Cramer J.P. et al. Rapid responses to 2 virus-like particle norovirus vaccine candidate formulations in healthy adults: a randomized controlled trial // *J. Infect. Dis.* – 2016. – P. 845–853.
47. Leroux-Roels G., Cramer J.P., Mendelman P.M. et al. Safety and immunogenicity of different formulations of norovirus vaccine candidate

- in healthy adults: a randomized, controlled, double-blind clinical trial // *J. Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 217. – P. 597–607.
48. Masuda T., Lefevre I., Mendelman P. et al. Immunogenicity of takeda's bivalent virus-like particle (VLP) norovirus vaccine (NoV) candidate in children from 6 months up to 4 years of age // *Open Forum Infect. Dis.* - 2018. – Vol. 5, Suppl. 1. - S674.
49. Guo L., Zhou H., Wang M. et al. A recombinant adenovirus prime-virus-like particle boost regimen elicits effective and specific immunities against norovirus in mice // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27. – P. 5233–5238.
50. Kim L., Liebowitz D., Lin K. et al. Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial // *JCI Insight.* – 2018. – Vol. 3: e121077.
51. Blazevic V., Lappalainen S., Nurminen K. et al. Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – P. 8126–8133.
52. Lappalainen S., Pastor A.R., Malm M. et al. Protection against live rotavirus challenge in mice induced by parenteral and mucosal delivery of VP6 subunit rotavirus vaccine // *Arch. Virol.* – 2015. – Vol. 160. – P. 2075–2078.
53. Malm M., Tamminen K., Lappalainen S. et al. Recombinant VP6 nanotubes act as an immunomodulator and delivery vehicle for norovirus virus-like particles // *J. Immunol. Res.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 9171632.
54. Tamminen K., Lappalainen S., Huhti L. et al. Trivalent combination vaccine induces broad heterologous immune responses to norovirus and rotavirus in mice // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8: e70409.
55. Malm M., Diessner A., Tamminen K. et al. Rotavirus VP6 as an adjuvant for bivalent norovirus vaccine produced in *nicotiana benthamiana* // *Pharmaceutics.* – 2019. – Vol. 11: e229.

56. Kocher J., Bui T., Giri-Rachman E. et al. Intranasal P particle vaccine provided partial cross-variant protection against human GII.4 norovirus diarrhea in gnotobiotic pigs // *J. Virol.* – 2014. – P. 88. – P. 9728–9743.
57. Tan M., Fang P., Chachiyo T. et al. Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction // *Virology.* – 2008. – Vol. 382. – P. 115–23.
58. Xia M., Tan M., Wei C. et al. A candidate dual vaccine against influenza and noroviruses // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – P. 7670–7677.
59. Wang X., Ku Z., Dai W. et al. A bivalent virus-like particle based vaccine induces a balanced antibody response against both enterovirus 71 and norovirus in mice // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33. P. 5779–5785.

## Энтеровирусные вакцины

Энтеровирусы (ЭВ) (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*, порядок *Picornavirales*) - многочисленная группа безоболочечных РНК-содержащих вирусов, способных вызывать различные по клинической картине и степени тяжести заболевания преимущественно у детей первых лет жизни. Энтеровирусная инфекция может проявляться в форме экзантемы полости рта и конечностей (hand, foot and mouth disease – HFMD), герпангины, менингита, менинго-энцефалита, энцефалита, полинейропатии, вялого паралича, миокардита и др. Тяжесть течения заболевания может варьировать от легкого лихорадочного состояния до мультисистемных проявлений с поражением сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. Часто ЭВ имеют эпидемическое распространение, охватывающее большие группы детского населения [1, 2].

На основе генетических характеристик и антигенных свойств ЭВ разделены на четыре вида (А – D), среди которых вирусы, относящиеся к видам *Enterovirus A* (ЭВ-А) и *Enterovirus B* (ЭВ-В), имеют наибольшее распространение [3]. Энтеровирусы вида ЭВ-А (энтеровирус А71, Коксаки А6, Коксаки А10, Коксаки А16 и др.) чаще всего вызывают HFMD у детей младшего возраста. Подавляющее большинство заболевших полностью выздоравливают через 7-10 дней. Однако у некоторых заболевших развиваются серьезные осложнения, вызванные поражением центральной нервной системы, описаны единичные летальные случаи. Представители вида ЭВ-В (вирусы Коксаки В3, Коксаки В5, ЕСНО25, ЕСНО30) чаще связаны с такими серьезными заболеваниями, как миокардит, асептический менингит, энцефалит и гепатит, нередко приводящими к инвалидности или смерти [3]. Среди ЭВ-В особо выделяются вирусы ЕСНО, поскольку являются причиной асептического менингита и энцефалита не только у детей, но и у взрослых [4]. Энтеровирусы распространены повсеместно, однако в странах Юго-Восточной Азии наибольшее эпидемическое значение имеют ЭВ-А, в странах,

расположенных на территориях Европы и Северной Америки – ЭВ-В [5,6]. Эпидемиологические исследования распространенности ЭВ на территории Российской Федерации показали, что в последнее время у детей и взрослых, больных энтеровирусным менингитом, часто выявляется вирус ЕСНО30 [7].

В мире для профилактики энтеровирусной инфекции разрабатываются вакцины, которые в основном направлены на предотвращение экзантемных форм заболевания, вызванных ЭВ-А71, Коксаки А6, Коксаки А10, Коксаки А16. Для ЭВ-В такие разработки направлены на вирус Коксаки В3, являющийся основной причиной миокардита [8]. В то же время в мире и в России часто регистрируются эпидемические подъемы заболеваемости, вызванные вирусом ЕСНО30 [9], однако вакцина для профилактики заболеваний, вызванных данным вирусом, отсутствует.

В связи с тем, что основной группой риска энтеровирусной инфекцией являются дети, то во всём мире ведется разработка вакцин против разных эпидемических типов неполиомиелитных энтеровирусных инфекций. Так, тяжёлая эпидемиологическая обстановка в Азиатско-Тихоокеанском регионе, связанная с энтеровирусом А71 (EV-A71), стала серьёзной угрозой для общественного здравоохранения, что определило усилия в первую очередь китайских исследователей по разработке типоспецифических вакцин для профилактики HFMD. Наиболее распространённой методикой стала классическая технология получения вакцин путём инактивации цельных вирионов. Тремя разработчиками (Sinovac Biotech, BeijingVigoo Biological и Китайской академией медицинских наук) были получены три прототипа инактивированных вакцин против EV-A71. В ходе клинических испытаний все три прототипа вакцины доказали свою безопасность и высокую эффективность для профилактики заболеваний, ассоциированных с EV-A71. [10, 11]. Существуют данные о разработке комбинированных и типоспецифических моновалентных вакцин на основе инактивированных вирусов CVA16, CVA6, CVA10. В результате доклинических испытаний моновалентная вакцина против CVA16 и двухвалентная против EV-A71 и

CVA16 показали свою хорошую иммуногенность и протективные свойства [12].

В настоящее время ведутся исследования, направленные на получение живых рекомбинантных вакцин на основе аттенуированных вирусов. В процессе адаптации CVA16 к диплоидной линии эмбриональных клеток лёгких человека КМВ17 был получен аттенуированный штамм К168-8Ас. При исследовании на макаках резусах вакцинация штаммом К168-8Ас показала высокую эффективность защиты от инфекции CVA16 [13]. Для получения аттенуированных вирусов широко применяется методика создания инфекционных клонов комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты энтеровирусов. Так, в исследованиях EV-A71 определено, что мутации в 5'-нетранслируемом регионе РНК или аминокислотные замены в белках вируса приводят к снижению вирулентности *in vitro* и *in vivo*. Показано, что замена цитозина на урацил в позиции 158 РНК в свою очередь снижала скорость трансляции полипротеина и вирулентность EV-A71 [14]. Аминокислотные замены в гене, кодирующем белок VP1 (G64R или G64T) и 3D полимеразы (S264L и L123F) также снижали вирулентность EV-A71 [15, 16]. Группой исследователей под руководством Р.Т.И. Yee и др. был сконструирован штамм EV-A71 (pY), в геном которого были встроены нуклеотидные последовательности - мишени для двух микроРНК (let-7a и miR-124a). В свою очередь такие изменения приводили к уменьшению числа копий РНК вируса (по сравнению с диким типом) в клетках, имеющих различное тканевое происхождение. Вакцинация штаммом pY защищала мышей от смертельной дозы EV-A71 [17]. Другой группой исследователей из США был создан живой ослабленный штамм CVB3 (Mt10), имеющий аминокислотную замену в области белка VP1 (H790A). Иммунизация мышей изменённым штаммом CVB3 (Mt10) защищала их от миокардита и панкреатита [18].

Показано, что живые аттенуированные вакцины являются высокоиммуногенными препаратами, однако их использование для создания поливалентных вакцин против энтеровирусов несёт некоторые риски. Для

неполиомиелитных энтеровирусов показано, что не только межвидовая, но и внутривидовая рекомбинации между геномами являются одним из факторов формирования новых эпидемических вариантов. При попадании вакцинных штаммов в организм, инфицированный диким вирусом, возникает риск формирования вариантов энтеровирусов с совершенно новыми свойствами [19].

В качестве альтернативного подхода к созданию вакцин выделяют технологию на основе субъединичных антигенов вирусов. Капсидные белки энтеровирусов являются их основными поверхностными антигенами. Линейные и конформационные эпитопы, связывание антител с которыми приводит к нейтрализации вируса обнаружены на белках, образующих капсид VP1, VP2 и VP3 [20]. Высокая вариабельность аминокислотных последовательностей поверхностных белков энтеровирусов приводит к тому, что антитела, нейтрализующие один тип вируса, не способны нейтрализовать другие типы. Неструктурные белки также содержат В-клеточные и Т-клеточные эпитопы, некоторые из которых вызывают перекрестные иммунные реакции с разными типами энтеровирусов [21].

Например, определено, что структурный поверхностный белок VP1 энтеровирусов проявляет сильную антигенную активность. Соответственно, несколько исследовательских групп приняли различные стратегии для получения и использования белка VP1 вируса EV-A71 для создания субъединичных вакцин. Ву и др. [22] получили рекомбинантный белок VP1 вируса EV-A71, экспрессируемый клетками *Escherichia coli* (*E. coli*). Очищенный белок VP1 затем прививали внутрибрюшинно взрослым самкам мышей. Хотя субъединичная вакцина на основе антигена VP1 могла защитить мышей-сосунков от более низких контрольных доз EV-A71 (230 полуметальных доз вируса на мышь), инактивированный вариант EV-A71-вакцины все же вызывал больший иммунный ответ, чем субъединичная вакцина на основе белка VP1, и защищала мышей-сосунков от летального исхода EV-A71-инфекции (2300 полуметальных доз вируса на мышь). В других исследованиях

Чжоу и др. [23] также экспрессировали рекомбинантный белок VP1 в *E. coli*, а затем вакцинировали кроликов очищенным белком VP1 или инактивированным (методом нагрева) вирусом EV-A71, что вызывало сопоставимые гуморальные и клеточные иммунные реакции. Более того, было обнаружено, что материнские антитела защищали новорожденных мышей от заражения EV-A71. Подобные EV-A71-специфичные антитела иммунизированных мышей получали с помощью баколовирусной системы, экспрессирующего VP1. При этом антисыворотки проявляли перекрестную нейтрализующую активность против различных субгенотипов EV-A71 [24].

Энтеровирусный белок VP1 также был использован в качестве антигена для разработки пероральных вакцин. Взрослых самок мышей BALB/c перорально иммунизировали трансгенными плодами томата, экспрессирующими белок VP1 [25], аттенуированным штаммом *Salmonella enterica Typhimurium*, экспрессирующим VP1 [26], *Bifidobacterium longum*, экспрессирующим VP1 [27], *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующим на поверхности VP1 [28], или рекомбинантный *Lactococcus Lactis*, экспрессирующим секреторный VP1 [29]. Все варианты вакцин, экспрессирующие VP1, вызывали иммунные реакции при пероральной иммунизации и могли защитить новорожденных мышей от инфекции EV-A71. Чен и др. [30] создали трансгенных мышей, которые могут экспрессировать VP1 и секретировать его в молоко, что в свою очередь защищало мышей-сосунов от заражения EV-A71. Однако рекомбинантные белки VP1 обычно проявляли меньшую защитную эффективность у мышей по сравнению с иммунизацией инактивированным вирусом EV-A71.

Синтетические пептиды также были использованы в качестве антигена для разработки вакцин против энтеровирусов. Такой альтернативный подход в перспективе считается более безопасным и эффективным для разработки поливалентных вакцин. Большинство исследований, было сосредоточено на использовании пептидов из состава основных структурных белков энтеровирусов (VP1, VP2, VP3 и VP4). Первоначально Фу и др. обнаружили,

что два пептида, SP55 (аминокислоты 163–177 белка VP1) и SP70 (аминокислоты 208–222 белка VP1), могут вызывать продукцию нейтрализующих антител против EV-A71. Использование SP70 способствовало наработке более высокого титра нейтрализующих антител (1:32), чем использование SP55 (1:8) в качестве антигена. Тем не менее, антисыворотка мышей, иммунизированных инактивированным нагреванием EV-A71, имела самый высокий титр нейтрализации - 1:128 [31]. Более того, Фу и др. [32] обнаружили, что антисыворотка, полученная с использованием антигена SP70, пассивно защищала мышей-сосунков как от гомологичных, так и от гетерологичных штаммов EV-A71.

В другом подходе к созданию вакцин были объединены шесть синтетических пептидов (P70–159 из VP2, P140–249 из VP2, P324–443 из VP2 и P746–876 из VP1), которые индуцировали образование специфической антисыворотки и пассивно защищали новорожденных мышей от инфекции EV-A71 [33]. Определено, что синтетический пептид VP2–28 (аминокислоты 136–150 VP2) проявляет перекрестно-нейтрализующую активность в отношении вируса EV-A71, а также способен связываться с моноклональным антителом против EV-A71 МАВ979 [34]. Сюй и др. [35] создали слитый белок с коровым белком вируса гепатита В (НВсАг) и эпитопом VP2, соответствующим аминокислотам 141–155 VP2. (НВсАг-VP2 (aa141–155)). Использование в качестве антигена НВсАг-VP2 (aa141–155) способствовало продукции перекрестно-нейтрализующих антитела к EV-A71. Антисыворотки, полученные от иммунизированных НВс-VP2 мышей (aa141–155), защищали новорожденных мышей от инфекции EV-A71.

Другая группа исследователей создали пептид, состоящий из трёх линейных эпитопов белка VP1 EV-A71, последовательно соединённых линкером (Gly4Ser). Тем не менее, несмотря на применение адъювантов, титры нейтрализующих антител после иммунизации мышей были в 4 раза ниже, чем у мышей, иммунизированных инактивированными типами вакцин [36].

Ау-Йонг и др. [37] попытались всесторонне картировать потенциальные синтетические пептиды в структурных и неструктурных белках EV-A71. Всего было синтезировано 63 синтетических пептида, которые использовались для характеристики линейных эпитопов В-клеток. Среди них синтетический пептид PEP27 (аминокислоты 142–156 белка VP1) был признан как наиболее IgM-специфичным иммунодоминантным эпитопом против EV-A71. Синтетический пептид PEP23 (аминокислоты 41–55 белка VP1) был идентифицирован как перекрестно-реактивный иммунодоминантный эпитоп IgG против EV-A71.

В настоящее время ведётся разработка прототипа мультиэпитопной вакцины на основе Т- и В-эпитопов для профилактики заболеваний, вызываемых EV-A71. С помощью анализа генома, были отобраны два эпитопа В-клеток, пять эпитопов для цитотоксических Т-лимфоцитов и два эпитопа для Т-хелперных лимфоцитов с высокой связывающей способностью. Для усиления иммуногенности в N-концевой части последовательности был добавлен препропротеин бета-дефензина 1 с линкером EAAAK. Предполагается, что полученный прототип мультиэпитопной вакцины будет обладать высокоиммуногенными свойствами, а также безопасен для использования [38].

Ещё одним подходом к созданию вакцин для профилактики энтеровирусной инфекции является технология ДНК-вакцин. Так, ведётся разработка ДНК-вакцины с использованием гена вирусного капсидного белка VP1 вируса EV-A71. Ген кодирующий белок вставлен в эукариотический вектор экспрессии pVAX1. Полученные конструкции тесировали *in vivo* на самках мышей Balb/c. Исследования показали, что уровень анти-VP1 IgG у мышей, иммунизированных прототипом ДНК-вакцины, увеличивались после первой иммунизации, но снижались после второй. Анти-VP1 IgG у мышей проявлял нейтрализующую активность против EV-A71 [39]. В другом исследовании группой учёных был сконструирован ДНК-вакцинный вектор, кодирующий ген VP1 вируса EV-A71 и ген mGITRL (pIRES/VP1/mGITRL).

Было показано, что глюкокортикоид-индуцированный белок, связанный с рецептором фактора некроза опухоли (GITR), и его лиганд (GITRL) участвуют в модуляции как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Полученным вектором иммунизировали самок мышей Balb/c. Было показано, что по сравнению с группами, которые были иммунизированы pIRES, pIRES/VP1, pIRES/mGITRL и PBS, иммунизация pIRES/VP1/mGITRL индуцировала более высокие уровни EV-A71 VP1-специфических антител и специфических антителообразующих клеток. Таким образом прототип ДНК-вакцины, экспрессирующий VP1 и mGITRL, может эффективно вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ против EV-A71 [40].

Показано, что мРНК-вакцины являются довольно эффективными для профилактики заболеваний, вызываемых оболочечными вирусами, такими как SARS-CoV-2 и RSV. Однако, их эффективность от безоболочечных вирусов, таких как пикорнавирусы, на данный момент ещё предстоит выяснить. Тем не менее, Уорнер и др. разработали и протестировали серию самоамплифицирующихся мРНК-вакцин, нацеленных на различные генотипы энтеровируса D68 (EV-D68). Авторы показали, что прототип вакцины был способен вызывать продукцию специфических антител у мышей и нечеловекообразных приматов, нейтрализующих энтеровирус D68. Кроме того, антитела предотвращали инфекцию верхних и нижних дыхательных путей и неврологические заболевания у мышей. Таким образом поливалентные мРНК-вакцины потенциально могут обеспечить широкую защиту от инфекции, вызванной энтеровирусом EV-D68 [41].

Вирусоподобные частицы, на основе белка вируса гепатита В (Core-антиген НВсAg) оказались удобной и эффективной платформой для презентации различных эпитопов благодаря их способности взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками. Кроме того, такие ВПЧ способны отображать гетерологичные эпитопы с высокой плотностью и оказывать помощь Т-клеткам. Core-антиген вируса гепатита В, способен к самосборке в два варианта ВПЧ: с симметрией T=3 или T=4. ВПЧ успешно

применяют для создания эффективного защитного потенциала используя высококонсервативные эпитопы SP55 и SP70 разных субгенотипов энтеровируса EV-A71. Получение таких изменённых частиц показало возможность создания универсальной вакцины против EV-A71 на основе ВПЧ и пептидов вируса [42].

С использованием экспрессионной системы бакуловируса (Vas-P1-3CD), коэкспрессирующего белки P1 вируса EV-A71 (под промотором полиэдрина) и 3CD (под промотором CMV-IE) в клетках Sf9 получена вирусоподобная частица EV-A71 (EV71-VLP) и ее химерные производные. Химеры EV-A71-VLP ChiEV-A71 (1E)-VLP и ChiEV-A71(4E)-VLP несут один эпитоп CVA16 PEP71 в VP1 или четыре консервативных эпитопа, соответственно, встроенных путем замещения соответствующих участков структурных белков EV-A71. Данные эпитопы способны вызывать продукцию специфических нейтрализующих IgG-антител против вируса CVA16 у мышей. Вакцинация полученными ВПЧ ChiEV-A71(1E)-VLP или ChiEV-A71(4E)-VLP привела к значительной продукции CVA16-специфических нейтрализующих антител и к перекрестной защите от инфекции CVA16 [43].

Использование небольших пептидов, имеющих относительно простую структуру, не представляет особых проблем для встраивания в выступающие петли мономеров ВПЧ. В тоже время длинные пептиды с более сложной структурой, требуют использования других платформ-носителей [44]. На примере Core-белка НВсАg было показано, что некоторые антигены, введенные в иммунодоминантные петли платформы НВсАg, способны нарушать целостность структуры ВПЧ, что в свою очередь накладывает значительные ограничения на выбор антигена. Для таких больших антигенов была разработана технология SplitCore, в которой белок НВсАg разделен на две части в пределах иммунодоминантной петли. Одновременная экспрессия обеих частей обеспечивает образование и самосборку ВПЧ. Слияние нужного антигена с концом одного из двух фрагментов приводит к экспонированию его на поверхности ВПЧ [45].

Экспонирование целых белковых молекул на поверхности ВПЧ позволяет представить иммунной системе несколько антигенных эпитопов. Кроме того, данный подход повышает вероятность правильного сворачивания белка в свою нативную конформацию. Тем не менее, большой размер белковых молекул может вызывать стерические помехи, что приводит к нарушению самосборки частиц [46]. Для устранения данной проблемы было разработано несколько способов к специфической презентации крупных антигенов. Одним из таких подходов явилось использование метода пространственного разделения доменов с помощью длинных гибких богатых глицином линкеров [47]. Несмотря на эффективность такого способа, оптимальная длина линкера для каждого отдельного случая определяется эмпирически. В некоторых случаях проблему самосборки и стабильности устраняют путем уменьшения содержания антигена на поверхности ВПЧ путём сборки частиц в присутствии как слитых, так и немодифицированных белков [48, 49]. Хотя такие методы могут привести к успешной сборке ВПЧ, тем не менее, данный способ может вызвать снижение иммуногенности за счет уменьшения количества антигена на поверхности. Примером такого эффекта является вакцина на основе ВПЧ против малярии [50].

Как было продемонстрировано ранее, для получения ВПЧ чаще всего используется система векторов экспрессии бакуловирусов (BEVS). Тем не менее существует альтернативная система на основе плазмид для экспрессии ВПЧ в клетках насекомых. В отличие от BEVS, она позволяет избежать загрязнения бакуловирусными частицами и их белками, может поддерживать жизнеспособность клеток на протяжении всего процесса, а экспрессия альфанодавиральных частиц не будет индуцироваться. Показано, что система на основе плазмид даёт ту же экспрессионную эффективность ВПЧ на основе белка VP1 норовируса, а также ВПЧ на основе белков VP0, VP1 и VP3 энтеровируса CVB3 [51].

Существуют данные об применении ВПЧ для презентации крупных антигенов на основе одного из белков фага *Acinetobacter* (AP205) и белка L1

папилломавируса [52, 53]. Для презентации больших белков высокие перспективы имеют платформы на основе технологий AviTag и SpyTag/SpyCatcher. AviTag позволяет конъюгировать антигены с ВПЧ после их сборки с помощью реакции биотин-стрептавидин (AviTag), а SpyTag/SpyCatcher (как уже было описано ранее) за счёт спонтанного образования необратимой изопептидной связи. С помощью данных подходов создается возможность проведения скрининга большого количества вакцин-кандидатов. На данный момент существует возможность использования ВПЧ и антигенов, полученных в разных системах экспрессии. Такой метод позволяет повысить стабильность ВПЧ если посттрансляционные модификации белков имеют решающее значение для иммуногенности [54]. Ван и др. создали вирусоподобную частицу, используя как основу полипротеин р55 ВИЧ (HIV-gag) в качестве носителя для экспрессии белка VP1 вируса EV-A71, который обеспечивал пассивную защиту новорожденных мышей от EV-A71-инфекции [55].

Проводятся исследования по встраиванию пептидов поверхностных белков энтеровирусов в вирусоподобные частицы на основе других вирусов. В своей работе Tian X. с соавторами сообщили о включении пептида SP70 энтеровируса EV-A71 в экспонированные на поверхности домены гексона аденовируса 3 типа (*Human adenovirus 3*). ВПЧ на основе аденовируса и энтеровируса была способна вызывать гуморальный ответ, специфичный для эпитопа SP70 [56]. Основной антиген вируса гепатита В (HBs), был использован для формирования ВПЧ с представленным на поверхности эпитопом белка VP2 энтеровируса CVA10 (136-150 а.к.). Такие вирусоподобные частицы смогли активировать сильный гуморальный ответ у мышей, а антитела нейтрализовали как основной штамм энтеровируса, так и другие клинические изоляты CVA10 [57]. Хуо и др. так же использовали пептиды структурных белков энтеровируса EV-A71 (SP70, аминокислоты 208–222 VP1) и CV-A16 (PEP91, аминокислоты 271–285 VP1), используя HBsAg в качестве белка-носителя. Химерная ВПЧ, экспрессирующая эпитопы

SP70 и PER91, индуцировала иммунный ответ и защищала мышей-сосунов от инфекции как от EV-A71, так и от CV-A16 [58].

Установлено, что для формирования вирусоподобных частиц достаточна совместная экспрессия только P1 и 3C областей генома, причем процесс самосборки происходил как при экспрессии белков в клетках насекомых [59], так в клетках дрожжей [60]. Данное свойство было использовано для получения ВПЧ энтеровирусов в качестве антигенов в составе вакцин. Китайская исследовательская группа на основе энтеровирусных ВПЧ создала четырехвалентную вакцину против главных возбудителей HFMD - вирусов EV-A71, CVA10, CVA6, CVA16 - и продемонстрировала ее способность вызывать у мышей протективный иммунитет. Титры нейтрализующих антител соответствовали титрам, продуцируемым на моновалентные вакцины, и защищали мышей как от единичной, так смешанной инфекции, вызванные вирусами EV-A71, CVA16, CVA6, CVA10 [61]. Тот же подход был использован для получения ВПЧ вируса EV-A71 генотипа С4а, возбудителя экзантемы полости рта и конечностей, а также нейроинфекции в Корее 2009 года [62]. С использованием эукариотических систем были получены ВПЧ вирусов CVB3 и CVB1 и разработан способ их производства с повышенным выходом и чистотой продукта [63]. Таким образом показано, что ВПЧ на основе различных энтеровирусов индуцируют мощный и длительный гуморальный иммунный ответ, что в свою очередь является решающим фактором для разработки высокоэффективных вакцин против энтеровирусов.

Экспрессия белка-предшественника P1 совместно с протеазой 3CD в дрожжах *Pichia pastoris* также приводила к самосборке ВПЧ энтеровирусов. В работе Zhang C. и др группа исследователей получила высокий выход рекомбинантных ВПЧ EV-A71 в дрожжей. При иммунизации мышей такие ВПЧ индуцировали высокие титры нейтрализующих антител против различных штаммов EV-A71. Стоит отметить, что иммунизация самок защищала рожденных ими мышат от летального исхода при заражении энтеровирусом EV-A71 [64]. Yang Z. с коллегами сообщили, что продукция

ВПЧ в созданной ими эукариотической системе, на основе штамма продуцента *P. Pastoris*, составляла до 270 мг/л [65]. Опубликованы результаты успешных доклинических испытаний данной кандидатной вакцины на грызунах и приматах, что послужило основанием для проведения клинических испытаний [66]. Также в клетках *P. pastoris* получены вирусоподобные частицы на основе EV-D68. На мышинных моделях показано, что ВПЧ способны вызывать продукцию антител нейтрализующие вирус в условиях *in vitro*. При этом, вакцинация самок защищала рожденных ими мышат-сосунков от летальных доз вируса. При пассивном переносе антител-содержащих сывороток мышам-реципиентам обеспечивалась их полная защита от вируса [67]. При использовании генетического материала термостабильного мутантного штамма PV-1 в штаммах *P. Pastoris* были получены ВПЧ, которые имели общие характеристики с ВПЧ, продуцируемыми клетками млекопитающих. Авторы исследования заключили, что ВПЧ на основе полиовируса, являются перспективной системой для профилактики полиовирусных инфекций [68].

Таким образом, разрабатываются разнообразные технологии и подходы к созданию инновационных вакцин на основе ВПЧ. Продолжается поиск новых молекулярных платформ для создания средств вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний, в том числе широким фронтом идет работа по созданию вакцин для профилактики заболеваний, вызываемых энтеровирусами, в том числе энтеровирусами вида В.

### Список литературы

1. Fomina S.G., Novikova N.A. Enteroviruses in children with gastroenteritis // Journal MediAl. – 2014. – Vol. 12, Suppl. 2. – P. 58–71.
2. Mao Q., Wang Y., Bian L., Xu M., Liang Z. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases // Emerging Microbes and Infections. – 2016. – Vol. 5, Suppl. 7. – e75. Doi: 10.1038/emi.2016.73.

3. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., et al. ICTV virus taxonomy profile: picornaviridae // *J. Gen. Virol.* – 2017. – Vol. 98, Suppl. 10. – P. 2421–2422. Doi: 0.1099/jgv.0.000911.
4. Xu W., Liu C., Yan L., et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications // *Virology J.* – 2012. – Vol. 9, Suppl. 8. – Doi: 10.1186/1743-422X-9-8.
5. Chang L.Y., Lin H.Y., Gau S.S., et al. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae // *J. Biomed. Sci.* – 2019. – Vol. 26, Suppl. 57. – Doi: 10.1186/s12929-019-0552-7.
6. Abedi G.R., Watson J.T., Pham H., et al. Enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2009-2013. // *Mmwr. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* – 2015. – Vol. 64. – P. 940–943. – Doi: 10.15585/mmwr.mm6434a3.
7. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Selivanova S.G., et al. Etiological structure of Enterovirus infection in the Russian Federation in 2017–2018 // *Zdorov'e naselenia i sreda obitania.* – 2019. – Vol. 8. – P. 30–38. – Doi: 10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38.
8. He X., Zhang M., Zhao C., et al. From monovalent to multivalent vaccines, the exploration for potential preventive strategies against hand, foot, and mouth disease (HFMD) // *Virologica Sinica.* – 2021. – Vol. 36. P. 167–175. – Doi: 10.1007/s12250-020-00294-3.
9. Lema C., Torres C., Van der Sanden S., et al. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages // *Virology.* – 2019. – Vol. 531. – P. 79–92. – Doi: 10.1016/j.virol.2019.02.012.
10. Zhu F., Xu W., Xia J., et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 370, Suppl. 9. – P. 818–28.
11. Lei D., Griffiths E., Martin J. WHO working group meeting to develop WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines // *Vaccine.* – 2020. – Vol. 38, Suppl. 32. – P. 4917–4923.

12. Cai Y., Ku Z., Liu Q., Leng Q., Huang Z. A combination vaccine comprising of inactivated enterovirus 71 and coxsackievirus A16 elicits balanced protective immunity against both viruses // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32, Suppl. 21. – P. 2406–2412.
13. Yang T., Xie T., Li H., et al. Immune responses of a CV-A16 live attenuated candidate strain and its protective effects in rhesus monkeys. *Emerg. Microbes Infect.* – 2020. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 2136–2146.
14. Yeh M.T., Wang S., Yu C.K., et al. A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, Suppl. 11. – P. e27082.
15. Meng T., Kwang J. Attenuation of human enterovirus 71 high-replication-fidelity variants in AG129 mice // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, Suppl. 10. – P. 5803–5815.
16. Tsa Y.H., Huang S.W., Hsieh W.S., et al. Enterovirus A71 containing codon deoptimized VP1 and high-fidelity polymerase as next-generation vaccine candidate // *J. Virol.* 2019. Vol. 93, Suppl. 13. P. e02308-18.
17. Yee P.T.I., Tan S.H., Ong K.C., et al. Development of live attenuated Enterovirus 71 vaccine strains that confer protection against lethal challenge in mice // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 4805.
18. Lasrado N., Gangaplara A., Massilamany C., et al. Attenuated strain of CVB3 with a mutation in the CAR interacting region protects against both myocarditis and pancreatitis // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11, Suppl. 1. – P. 12432
19. Muslin C., Kain A.M., Bessaud M., et al. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, Suppl. 9. – P. 859.
20. Huang K.A. Structural basis for neutralization of enterovirus // *Current Opinion in Virology*. – 2021. – Vol. 51. – P. 199-206.

21. Aw-Yong K.L., NikNadia N.M.N., Tan C.W., et al. Immune responses against enterovirus A71 infection: Implications for vaccine success. *Rev. Med. Virol.* – 2019. – Vol 29, Suppl. 5. – e2073.
22. Wu C.N., Lin Y.C., Fann C., et al. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus // *Vaccine.* – 2001. – Vol. 20, Suppl. 5–6. – P. 895–904.
23. Zhou S.L., Ying X.L., Han X., et al. Characterization of the enterovirus 71 VP1 protein as a vaccine candidate // *J Med Virol.* – 2015. – Vol. 87, Suppl. 2. – P. 256–262.
24. Meng T., Kolpe A.B, Kiener T.K., Chow V.T., et al. Display of VP1 on the surface of baculovirus and its immunogenicity against heterologous human enterovirus 71 strains in mice // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, Suppl. 7. – e21757.
25. Chen H.F., Chang M.H., Chiang B.L., et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71 // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24, Suppl. 15. – P. 2944–2951.
26. Chiu C.H., Chu C., He C.C., et al. Protection of neonatal mice from lethal enterovirus 71 infection by maternal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing VP1 of enterovirus 71 // *Microbes Infect.* – 2006. Vol. 8, Suppl. 7. – P. 1671–1678.
27. Yu Z., Huang Z., Sao C., et al. Oral immunization of mice using *Bifidobacterium longum* expressing VP1 protein from enterovirus 71 // *Arch Virol.* – 2013. – Vol. 158, Suppl. 5. – P. 1071–1077.
28. Zhang C., Wang Y., Ma S., et al. Human Enterovirus 71 protein displayed on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* as an Oralvaccine // *Viral Immunol.* – 2016. – Vol. 29, Suppl. 5. – P. 288–295.
29. Xu P., Wang Y., Tao L., et al. Recombinant *Lactococcus lactis* secreting viral protein 1 of enterovirus 71 and its immunogenicity in mice // *Biotechnol Lett.* – 2019. – Vol. 41, Suppl. 6–7. – P. 867–872.

30. Chen H.L., Huang J.Y., Chu T.W., et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice: a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, Suppl. 23. – P. 2882–2889.
31. Foo D.G., Alonso S., Phoon M.C., et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides // *Virus Res.* – 2007. – Vol. 125, Suppl. 1. – P. 61–68.
32. Foo D.G., Alonso S., Chow V.T., et al. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide // *Microbes Infect.* – 2007. – Vol. 9, Suppl. 11. – P. 1299–1306.
33. Liu J.N., Wang W., Duo J.Y., et al. Combined peptides of human enterovirus 71 protect against virus infection in mice // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, Suppl. 46. – P. 7444–7451.
34. Liu C.C., Chou A.H., Lien S.P., et al. Identification and characterization of a cross neutralization epitope of Enterovirus 71 // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29, Suppl. 26. – P. 4362–4372.
35. Xu L., He D., Li Z., et al. Protection against lethal enterovirus 71 challenge in mice by a recombinant vaccine candidate containing broadly cross-neutralizing epitope within the VP2 EF loop // *Theranostics*. – 2014. – Vol. 4, Suppl. 5. – P. 498–513.
36. Anasir M.I., Poh C.L. Advances in antigenic peptide-based vaccine and neutralizing antibodies against viruses causing hand, foot, and mouth disease // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, Suppl. 6. – P. 1256.
37. Aw-Yong K.L., Sam I.C., Koh M.T., et al. Immunodominant IgM and IgG epitopes recognized by antibodies induced in Enterovirus A71-associated hand, Foot and Mouth Disease Patients // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, Suppl. 11. – e0165659.
38. Swain S.K., Panda S, Sahu B.P., et al. Inferring B-cell derived T-cell receptor induced multi-epitope-based vaccine candidate against enterovirus 71: a

- reverse vaccinology approach // *Clin Exp Vaccine Res.* – 2024. – Vol. 13, Suppl. 2. – P. 132-145.
39. Wong S.T., Sazaly A.B., Zamberi S., et al. DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immuneresponse in mice // *Genetic Vaccines and Therapy.* – 2007. – Vol 5. – P. 6
40. Jing Yuan, Xinyi Tang, Kai Yin, et al. GITRL as a genetic adjuvant enhances enterovirus 71 VP1 DNA vaccine immunogenicity // *Immunol Res.* – 2015. – Vol. 62. – P. 81–88.
41. Warner N.L., Archer J., Park S., et al. A self-amplifying RNA vaccine prevents enterovirus D68 infection and disease in preclinical models // *Sci Transl Med.* – 2024. – Vol. 16, Suppl. 759. – eadi1625.
42. Ye X., Ku Z., Liu Q., et al. Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, Suppl. 1. – P. 72–81.
43. Luo J., Huo C., Qin H., et al. Chimeric enterovirus 71 virus-like particle displaying conserved coxsackievirus A16 epitopes elicits potent immune responses and protects mice against lethal EV71 and CA16 infection // *Vaccine.* – 2021. – Vol. 39, Suppl. 30. – P. 4135-4143.
44. Anggraeni M.R., Connors N. K., Wu Y., et al. Sensitivity of immune response quality to influenza helix 190 antigen structure displayed on a modular virus-like particle. *Vaccine.* – 2013. – Vol 31, Suppl. 40. – P. 4428–4435.
45. Walker A., Skamel C., Nassal M. SplitCore: An exceptionally versatile viral nanoparticle for native whole protein display regardless of 3D structure // *Sci. Reports.* – 2011. – Vol. 1. – P. 5
46. Lua L.H.L., Fan Y., Chang C., et al. Synthetic biology design to display an 18 kDa rotavirus large antigen on a modular virus-like particle // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33, Suppl. 44. – P. 5937–5944.

47. Kratz P. A., Bottcher B., Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids // *PNAS USA*. – 1999. – Vol. 96, Suppl. 5. – P. 1915–1920.
48. Peyret H., Gehin A., Thuenemann E.C., et al. Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins // *PLOS One*. – 2015. – Vol. 10, Suppl. 4. – P. e0120751.
49. Tekewe A., Fan Y., Tan E., et al. Integrated molecular and bioprocess engineering for bacterially produced immunogenic modular virus-like particle vaccine displaying 18 kDa rotavirus antigen Biotech // *Bioeng*. – 2017. – Vol. 114, Suppl. 2. – P. 397–406.
50. Pitoiset F., Vazquez T., Bellier B. Enveloped virus-like particle platforms: Vaccines of the future? // *Exp. Rev. of Vaccines*. – 2015. – Vol. 14, Suppl. 7. – P. 913–915.
51. Lampinen V., Gröhn S., Lehmler N., et al. Production of norovirus-, rotavirus-, and enterovirus-like particles in insect cells is simplified by plasmid-based expression. *Sci Rep*. – 2024. – Vol. 14, Suppl. 1. – P. 14874.
52. Thrane S., Janitzek C. M., Agerbæk M.Ø., et al. A novel virus-like particle based vaccine platform displaying the placental malaria antigen VAR2CSA // *PLOS One*. – 2015. – Vol. 10, Suppl. 11. – P. e0143071.123.
53. Thrane S., Janitzek C. M., Matondo S., et al. Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines // *J. Nanobiotech*. – 2016. – Vol. 14. – P. 30.
54. Brune K.D., Leneghan D.B., Brian I.J., et al. Plug-and-display: Decoration of virus-like particles via isopeptide bonds for modular immunization // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 19234.
55. Wang X., Dong K., Long M., et al. Induction of a high-titered antibody response using HIVgag-EV71 VP1-based virus-like particles with the capacity to protect newborn mice challenged with a lethal dose of enterovirus 71 // *Arch Virol*. – 2018. – Vol. 163, Suppl. 7. – P. 1851–1861.

56. Tian X., Su X., Li X., et al. Protection against enterovirus 71 with neutralizing epitope incorporation within adenovirus type 3 hexon // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, Suppl. 7. – e41381.
57. Dai W., Xiong P., Zhang X., et al. Recombinant virus-like particle presenting a newly identified coxsackievirus A10 neutralization epitope induces protective immunity in mice // *Antiviral Res.* – 2019. – Vol. 164. – P. 139-146.
58. Huo C., Yang J., Lei L., et al.. Hepatitis B virus core particles containing multiple epitopes confer protection against enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infection in mice // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35, Suppl. 52. – P.7322–7330.
59. Chung C.Y., Chen C.Y., Lin S.Y., et al. Enterovirus 71 virus-like particle vaccine: improved production conditions for enhanced yield // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, Suppl. 43. – P. 6951–6957.
60. Li H.Y., Han J.F., Qin C F., Chen R. Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potently elicits protective immune responses in mice // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31, Suppl. 32. – P. 3281–87.
61. Zhang W., Dai W., Zhang C. et al. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity // *Emerg. Microbes Infect.* – 2018. – Vol. 7, Suppl. 1. – P. 94
62. Kim H. J., Son H., Lee S. W., et al. Efficient expression of enterovirus 71 based on virus-like particles vaccine. *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14, Suppl. 3. – e0210477.
63. Hankaniemi M.M., Baikoghli M.A., Stone V.M., et al. Structural insight into CVB3-VLP non-adjuvanted vaccine // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, Suppl. 9. – P. 1287.
64. Zhang C., Ku Z., Liu Q., et al. High-yield production of recombinant virus-like particles of enterovirus 71 in *Pichia pastoris* and their protective efficacy

- against oral viral challenge in mice // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33, Suppl. 20. – P. 2335–2341.
65. Yang Z., Gao F., Wang X., et al. Development and characterization of an enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLPs) vaccine produced in *Pichia pastoris* // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2020. – Vol. 16, Suppl. 7. – P. 1602-1610.
66. Wang Z., Zhou C., Gao F., et al. Preclinical evaluation of recombinant HFMD vaccine based on enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLP): Immunogenicity, efficacy and toxicology // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39, Suppl. 31. – P 4296-4305.
67. Zhang C., Zhang X., Zhang W., et al. Enterovirus D68 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris* potently induce neutralizing antibody responses and confer protection against lethal viral infection in mice // *Emerg. Microbes Infect.* – 2018. – Vol. 7, Suppl. 1. – P. 3.
68. Sherry L., Grehan K., Snowden J. S., et al. Comparative molecular biology approaches for the production of poliovirus virus-like particles using *Pichia pastoris* // *mSphere*. – 2020. – Vol. 5, Suppl. 2. – P. e00838-19.

## Прототип вакцины против норовирусной инфекции

В этиологической структуре вирусных острых кишечных инфекций норовирусы (сем. *Caliciviridae*, род *Norovirus*) находятся на втором месте после ротавирусов. В странах, проводящих вакцинацию против ротавирусов, они вышли на первое место [1, 2]. В группы риска заражения норовирусами входят дети, молодые и пожилые люди. Вспышки инфекции регистрируются в течение всего года с подъёмом заболеваемости в весенние и летние месяцы. Норовирус человека представляет собой икосаэдрический вирус без оболочки, имеет геном в виде одноцепочечной позитивно-смысловой РНК, длиной примерно 7,5-7,7 кб, кодирующей три открытые рамки считывания. ORF1 кодирует большой полипротеин, предшественник шести неструктурных белков (NS1/2 - NS7). ORF2 кодирует основной структурный белок VP1 капсида. ORF3 кодирует минорный структурный белок VP2 капсида, который расположен внутри вирусной частицы. Капсид вируса построен из наружного (VP1) и внутреннего (VP2) белков. VP1 способен самособирается в вирусоподобные частицы, которые практически не отличимы от нативных вирионов и обладают выраженными иммуногенными свойствами. Для норовирусов известно десять геногрупп, на основе анализа аминокислотной последовательности наружного капсидного белка VP1 выделено 48 генотипов. Наиболее распространенной геногруппой норовирусов является GII, на долю которой в Российской Федерации приходится большинство случаев норовирусного гастроэнтерита детей первых лет жизни. Так, в Свердловской области в 2022 году наибольший удельный вес в генотипической структуре циркулирующих норовирусов занимали норовирусы, относящиеся к геногруппе GII (58%) Сходные данные были получены в ходе молекулярно-эпидемиологического анализа генетических вариантов норовируса в ряде других Европейских стран, а также в Японии и Китае. В отдельные годы на долю геногруппы GII приходилось до 80-90% случаев норовирусного гастроэнтерита детей. К доминирующим вариантам вируса этой геногруппы

относят норовирус GII.4 [3, 4]. Значимость норовирусов в инфекционной патологии человека и опасность возникновения крупных эпидемических вспышек в организованных коллективах определяют необходимость разработки средств специфической профилактики инфекции. На примере успешного внедрения ротавирусной вакцины показано, что программы вакцинации могут значительно снизить количество случаев гастроэнтерита [5].

Целью настоящей работы авторского коллектива явилось получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и анализ его свойств как возможного прототипа вакцины для профилактики норовирусной инфекции.

Анализ нуклеотидных последовательностей, дизайн олигонуклеотидов, конструирование гена, расчет молекулярной массы белка, изоэлектрической точки и коэффициента экстинкции осуществляли с помощью пакета программного обеспечения Lasergene 7.1.0 (Dnastar, Inc, США). Оптимизацию кодонов проводили на основе базы данных Codonusage database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). В работу была взята нуклеотидная последовательность VP1 эпидемического варианта норовируса с генотипом GII.4, доминирующего на территории Нижегородской области. Нуклеотидные последовательности секвенировали с использованием генетического анализатора ABI Prism 310 (Thermo Fisher Scientific, США).

Клетки *E. coli*, штамм Rosetta 2 (DE3), трансформированные полученной генетической конструкцией на основе плазмиды pET22b и кодирующей VP1 норовируса, выращивали в среде LB-Miller (pH 7.0). Индукцию синтеза белка проводили путем добавления IPTG до конечной концентрации 0.5 мМ к каждой из культур. Биомассы клеток получали центрифугированием, лизировали в растворе, содержащем 25 мМ HEPES (pH 7.5), 1 М хлорида натрия, 10 % глицерина, 1 % Triton X-100, ДНКазы I (10 мкг/мл), РНКазы А (10 мкг/мл) и лизоцима (50 мкг/мл), 0.2 мМ PMSF,

дезинтегрировали ультразвуком с помощью QSonica Q55 (QSonica sonicators, США), центрифугировали и добавляли промывочный буфер, содержащий 25 мМ HEPES (pH 7.5), 1 М хлорид натрия, 10% глицерина, 1 М мочевины с последующим центрифугированием. Выделение VP1 норовируса проводили методом металло-хелатной хроматографии в денатурирующих условиях с помощью сорбента Ni-NTA Superflow (GEHealthcare, Великобритания). Ренатурацию VP1 проводили с помощью диализа. Электрофорез белков в 12 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили общепринятым методом. Микрофотографии вирусоподобных частиц, образуемых VP1 норовируса, получали с помощью электронного микроскопа HT7700 (Hitachi, Япония). Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c возрастом 8 недель весом 16-18 г. Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственными стандартами ГОСТ 33216-2014 ГОСТ 33215-2014. Биоматериал для исследования брали у мышей с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах европейского сообщества (86/609/ЕС).

Исследования проводились согласно биоэтическим и этическим принципам, установленным Хельсинской декларацией (принятой в июне 1964 г. (г. Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2013 г. (г. Форталеза, Бразилия). Для оценки антигенных свойств рекомбинантных белков использовали 637 образцов плазмы крови, полученных из диагностического центра «Гемохелп» (ООО "ТИАС ЛОТУС") от лиц в возрасте 19-44 лет, обратившихся для проведения диагностических исследований и давших письменное согласие на использование их биоматериала в исследовании.

Определение антител к VP1 норовируса проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. VP1 сорбировали в лунки планшетов в концентрации 1 мкг/мл в течение 18 часов при 20°C. Тестируемую сыворотку крови мышей разводили с шагом 2, плазму крови

волонтеров разводили перед тестированием с шагом 10. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку не иммунизированных мышей. При определении антител в крови лабораторных животных использовали конъюгированные с пероксидазой корня хрена кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши. При определении антител человека использовали конъюгированные с пероксидазой корня хрена кроличьи антитела против иммуноглобулинов классов IgG, IgM и IgA. За положительную реакцию принимали значение оптической плотности больше среднего значения отрицательного контроля, умноженного на три. Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Software, США). Различия в данных считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

В начало нуклеотидной последовательности, кодирующей белок VP1 эпидемически значимого штамма норовируса генотипа GI.4, был внесен сайт для эндонуклеазы рестрикции NdeI. К последовательности, кодирующей C-терминальную часть белка, была добавлена нуклеотидная последовательность, кодирующая шесть гистидинов, стоп кодон (TAA) и сайт для рестриктазы XhoI, использованные для последующего молекулярного клонирования. Полученную последовательность синтезировали в фирме «Евроген», Москва. Последовательность, кодирующая VP1, была перенесена в плазмиду pET22b (Thermo Fisher Scientific, США), позволяющую с высокой эффективностью экспрессировать рекомбинантные белки в штаммах *E. coli*, содержащих в геноме DE3 лизоген [6].

Полученной генетической конструкцией, кодирующей VP1 норовируса, трансформировали клетки *E. coli*, штамм Rosetta 2 (DE3). Была оценена эффективность продукции белка, составившая 20–40 мг белка на 1 литр клеточной культуры. Белок формировал “тельца включения”. Определен

оптимальный состав среды и условия культивирования трансформированных клеток *E. coli*. Максимальная плотность культуры клеток ( $OD_{600}=2,8$ ) соответствовала 5 г биомассы на 1 л культуры в среде LB, содержащей 0,5 % глицерина и 25 мМ фосфатного буфера, pH 7.4. Оптимальная концентрация IPTG составила 0,5 мМ, оптимальная температура для экспрессии белков соответствовала 30 °С, а время индукции – 4-8 часам.

В результате последующей очистки с помощью металл-хелатной хроматографии в присутствии 8 М мочевины и рефолдинга путем диализа против раствора, содержащего 25 мМ HEPES pH 7,5, 150 мМ хлорид натрия и 5 % глюкозы, получен растворимый белок, имеющий расчетную молекулярную массу 60,6 кДа, состоящий из 560 аминокислот, имеющий изоэлектрическую точку, равную 6,15 и коэффициент экстинкции 1,04 (рис. 3).

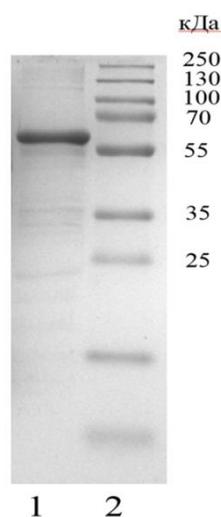


Рис. 3 - Электрофореграмма очищенного VP1 белка норовируса. 1 – VP1, 2- маркеры молекулярной массы

Белок наработан в препаративных количествах и использован для оценки способности формировать вирусоподобные частицы и для иммунизации лабораторных мышей. На рисунке 4 представлена электронно-микроскопическая фотография, свидетельствующая о способности

рекомбинантного белка VP1 образовывать вирусоподобные частицы диаметром от 30 до 50 нм, что соответствует данным других авторов [7].

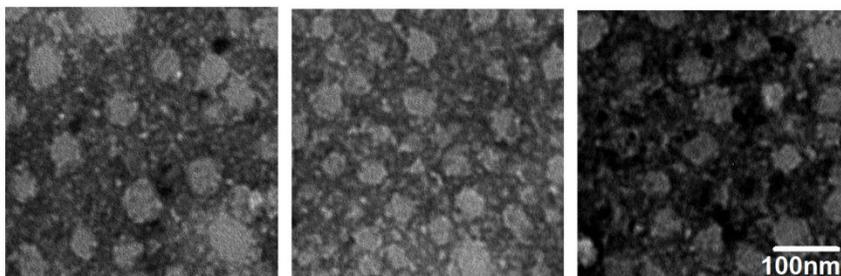
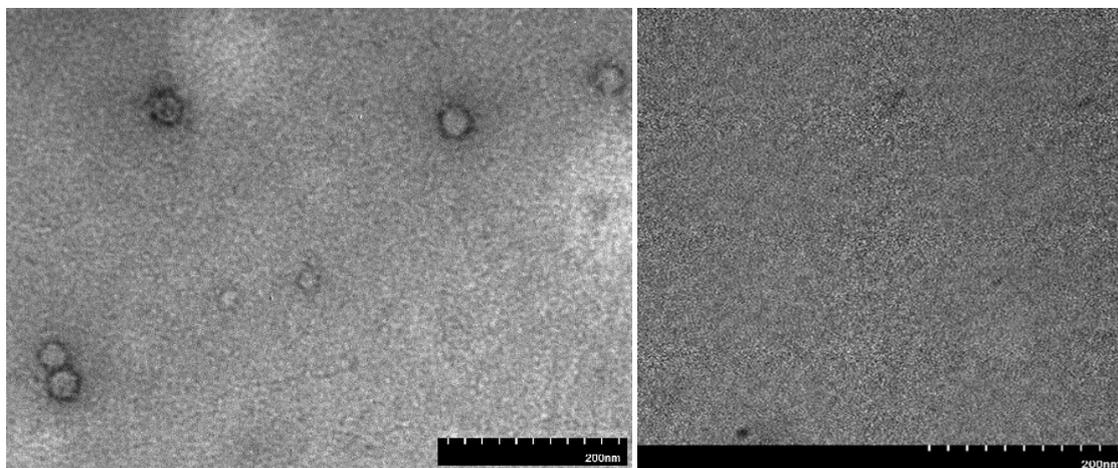


Рис. 4 - Электронно-микроскопическая фотография вирусоподобных частиц, образуемых рекомбинантным VP1 норовируса. Контрастирование 3%-ным уранилацетатом, рН 4,6.

Двукратная внутрибрюшинная иммунизация 10 лабораторных мышей с интервалом в 2 недели и последующим получением сыворотки крови через три недели после второй иммунизации в дозе 10 мкг (0,5 мл) приводила к образованию в крови животных антител против VP1 норовируса. Антитела в крови животных обнаруживались в титрах от 1:512 до 1:8192. Иммунизация животных той же дозой белка по той же схеме, но в смеси с 100 мг гидроокиси алюминия вызвала появление антител к VP1 норовируса в титрах от 1:1024 до 1:32768. Таким образом, показано, что полученный рекомбинантный белок способен вызвать выраженный антительный ответ как в присутствии гидроокиси алюминия, так и без него. Антитела обладают способностью взаимодействовать с диким норовирусом (изолят НВ262/21), выделенным от больного норовирусным гастроэнтеритом сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИЭМ им. И. Н. Блохиной, что подтверждается данными иммуноэлектронной микроскопии (рис. 5). Антитела сорбировали на подложки сеточек для электронной микроскопии. Затем на 30 минут наносили суспензию вируса, выделенного от больного норовирусным гастроэнтеритом (изолят НВ262/21), отмывали и проводили электронную микроскопию. В контроле, не

показавшем сорбции вируса на подложке, использовали дикий штамм вируса E30.



А

В

Рисунок 5 - Декорирование вирусных частиц (А - изолят NB262/21 норовируса; В – изолят E30-eC2 энтеровируса E30) антителами, полученными при иммунизации мышей рекомбинантным белком VP1 норовируса.

Поскольку норовирус широко циркулирует среди населения, закономерно ожидать наличия антител к его белкам в крови людей. Проведена оценка наличия антител разных классов к полученному рекомбинантному белку в крови лиц, проживающих в средней полосе Российской Федерации. Определяли частоту обнаружения антител к VP1 в образцах плазмы крови 637 волонтеров. Как следует из рисунка антитела класса IgG обнаруживались у 14,8% волонтеров, антитела класса IgM – у 7,1% волонтеров, антитела класса IgA – у 38,5% волонтеров. Суммарная встречаемость антител составила 47,4%. Полученные данные свидетельствуют о том, что эпитопы полученного нами рекомбинантного VP1 норовируса GII.4 распознаются антителами, присутствующими в крови человека. Однако, титры антител класса IgG в большинстве своем были невелики и превышали у антитело-положительных

волонтеров величину, равную и более 1:1000, только в 4,3% случаев (4 из 94), что свидетельствует о давнем инфицировании этих лиц норовирусом. У волонтеров, имевших антитела к VP1 норовируса класса IgA, высокие титры (равные и более 1:1000) обнаруживались со сходной частотой (4,9% случаев). В то же время из 25 волонтеров, имевших антитела к VP1 норовируса класса IgM, титры, равные 1:1000 и более, обнаружены в 16,0% случаев. Вероятно, эти лица имели недавний контакт с вирусом.

Полученные данные о частоте встречаемости антител против VP1 норовируса GII.4 и их титрах соответствуют результатам других авторов. Сообщается о широком разбросе в частоте обнаружения антител и их титрах у лиц разного возраста, проживающих в разных странах. Суммарная частота обнаружения колеблется от 25 до 95 %. При этом наблюдается перекрестная реактивность с норовирусами других геногрупп [8, 9].

Белок VP1 норовируса состоит из двух доменов, принимающих участие в самосборке вирусоподобных частиц [10]. Способность VP1 норовируса к самосборке может быть использована для получения образующих вирусоподобные частицы химерных белков, состоящих из S-домена VP1 норовируса и фрагментов других белков, выступающих в качестве антигена. То есть, существует возможность декорирования разными антигенами вирусоподобных частиц норовируса, что продемонстрирована работами ряда авторов [11, 12, 13]. Генетическая конструкция, кодирующая полученный нами рекомбинантный белок, может быть применена в качестве молекулярной платформы для создания химерных вирусоподобных частиц на основе VP1 норовируса.

Таким образом, полученный нами рекомбинантный VP1 норовируса, экспрессированный в *E. coli*, способен формировать вирусоподобные частицы, проявляет иммуногенность у мышей в отсутствии и присутствии адьюванта и распознается антителами человека классов IgG, IgM, IgA. Результаты работы свидетельствуют о возможности использования рекомбинантного VP1 в

качестве антигена при конструировании вакцины для профилактики норовирусной инфекции, основанной на вирусоподобных частицах.

### Список литературы

1. Black R. E., Perin J., Yeung D. et al. Estimated global and regional causes of deaths from diarrhoea in children younger than 5 years during 2000-21: a systematic review and Bayesian multinomial analysis // *Lancet Glob. Health.* – 2024, - Vol. 12(6): e919-e928. DOI: 10.1016/S2214-109X(24)00078-0.
2. Jeon K., Lee S. K., Jeong S. et al. Trends in the detection of viruses causing gastroenteritis over a 10-year period and impact of nonpharmaceutical interventions // *J. Clin. Virol.* – 2024. Vol. 172. – P. 105676. DOI: 10.1016/j.jcv.2024.105676.
3. van Beek J., de Graaf M., Al-Hello H. et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network // *Lancet Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 18(5)/ - P. 545-553. DOI: 10.1016/s1473-3099(18)30059-8
4. Быков Р. О., Скрябина С. В., Килячина А. С. и др. Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 год // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2023. – Т.100(4). – С. 306–313. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-402>.
5. Burnett E., Parashar U., Tate J. Rotavirus vaccines: Effectiveness, safety, and future directions // *Paediatric Drugs.* – 2018. – Vol. 20. – P. 223–233. DOI: 10.1007/s40272-018-0283-3.
6. Mokhonov V. V., Vasilenko E. A., Gorshkova E. N. et al. Slyd-deficient *Escherichia coli* strains: a highway to contaminant-free protein extraction //

- Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2018. – Vol. 499(4). – P. 967-972. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.029.
7. Lampinen V., Gröhn S., Soppela S., et al. SpyTag/SpyCatcher display of influenza M2e peptide on norovirus-like particle provides stronger immunization than direct genetic fusion. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13: 1216364. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1216364
  8. Kobayashi S., Fujiwara N., Rockx B. et al. Characterization of the homo- and heterotypic immune responses after natural norovirus infection // *J. Med. Virol.* 2005. – Vol. 77. – P. 439–446. DOI: 10.1002/jmv.20473
  9. Takeda N., Minagawa H. Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan // *Microbiol. Immunol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 356–359. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2009.00132.x
  10. Tan M., Fang P., Chachiyo T. et al. Noroviral particle: Structure, function and applications in virus-host interaction // *Virology.* – 2008. – Vol. 382. – P. 115–123. DOI: 10.1016/j.virol.2008.08.047
  11. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В. и др. Получение вирусоподобных частиц норовируса, содержащих VP1 эховируса 30 // *Вопросы вирусологии.* – 2021. – Т. 66(5). – С. 383-389. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>
  12. Tamminen K., Heinimäki S., Vesikari T., Blazevic V. Rotavirus VP6 Adjuvant Effect on Norovirus GII.4 Virus-Like Particle Uptake and Presentation by Bone Marrow-Derived Dendritic Cells In Vitro and In Vivo // *J. Immunol. Res.* – 2020. – Vol. 3194704. eCollection 2020. DOI: 10.1155/2020/3194704.
  13. Boonyakida J., Khoris I. M., Nasrin F., Park E.Y. Improvement of Modular Protein Display Efficiency in SpyTag-Implemented Norovirus-like Particles // *Biomacromolecules.* – 2023. – Vol. 24(1). – P. 308-318. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c01150.

## Прототип вакцины против вируса E30

Неполиомиелитные энтеровирусы способны поражать различные системы органов и тканей, вследствие чего заболевание характеризуется полиморфизмом клинических проявлений. Наиболее частым проявлением энтеровирусной инфекции, требующим госпитализации, является асептический серозный менингит (или энтеровирусный менингит). При этом энтеровирусы могут быть причиной до 90,0% случаев серозного менингита с подтверждённой этиологией у детей и взрослых. Серозные менингиты распространены повсеместно как в форме спорадической заболеваемости, так и в форме вспышек, нередко весьма масштабных, что усиливает их социальное и экономическое значение. Этиологическими агентами энтеровирусного менингита являются преимущественно вирусы ЕСНО (от англ. enteric cytopathic human orphan viruses), среди которых наиболее часто детектируются echovirus 30, echovirus 9, echovirus 6. По сравнению с менингитом, вызванным непполиомиелитными энтеровирусами других типов, инфекция echovirus 30 (E30) протекает в среднем тяжелее и длительнее. Зарегистрированы случаи выявления E30 у больных герпангиной, экзантемой, энцефалитом, менингоэнцефалитом, острым вялым параличом [<http://rospotrebnadzor.ru/documents/documents.php>]. Социально-экономическая значимость E30, обусловленная возможностью летального исхода и стоимостью стационарного лечения, определяет необходимость разработки средств его вакцинопрофилактики.

Нами проведены работы по получению прототипа вакцины для профилактики инфекции, вызываемой вирусом E30. Использованная для этого нуклеотидная последовательность, кодирующая VP1 эпидемического варианта echovirus 30, распространенного на территории Нижегородской области в 2018 г., была предоставлена сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. На первом этапе работы были

получены рекомбинантные белки VP1 VP2 и VP3 вируса. Для этого в начало последовательностей, кодирующих белки, был внесен сайт для эндонуклеазы рестрикции NdeI. К последовательностям, кодирующим С-терминальные части каждого белка, была добавлена нуклеотидная последовательность, кодирующая шесть остатков гистидина, стоп кодон (ТАА) и сайт для рестриктазы XhoI, необходимый для последующего молекулярного клонирования. Сконструированные последовательности синтезировали химически. Затем синтезированные последовательности перенесли в плазмиду pET22b («Invitrogen», США), которая позволяет с высокой эффективностью экспрессировать рекомбинантные белки в штаммах *E. coli*, содержащих в геноме  $\lambda$ DE3 лизоген. Для подтверждения наличия целевых генов в составе плазмид экспрессионные векторы были секвенированы. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli*, которые использовали для наработки белков. С помощью Вестерн-блота было показано, что клетки *E. coli* Rosetta 2 (DE3), трансформированные плазмидами pET22-VP1<sub>E30</sub>, pET22-VP2<sub>E30</sub>, или pET22-VP3<sub>E30</sub>, экспрессируют белки, содержащие последовательность из 6 остатков гистидина и имеющие молекулярную массу 34, 30 и 28 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе VP1 VP2 и VP3 (рис. 6). Наибольшей продуктивностью обладал продуцент белка VP1<sub>E30</sub>.

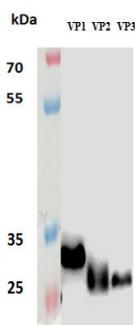


Рисунок 6 – Сравнение уровней экспрессии белков VP1, VP2 и VP3 вируса E30 клетками *E. coli* Rosetta 2 (DE3) методом Вестерн-блот

Для получения очищенных препаратов рекомбинантных белков использовали аффинную хроматографию в денатурирующих условиях. Нерастворимую фракцию белков штаммов-продуцентов растворяли в буферном растворе, содержащем 6М гуанидин гидрохлорида, наносили на колонку, содержащую металл-хелатную сефарозу, промывали и элюировали раствором, содержащим имидазол. Очищенные белки выводили в растворимую форму путем диализа буферных растворов разного состава pH7,5 (рис. 7). Продуктивность штаммов-продуцентов оценивали по конечному выходу очищенных растворимых белков на 1 литр культуры. Для VP1<sub>E30</sub> выход составил 8,58 мг белка, VP2<sub>E30</sub> – 56,81 мг, а для VP3<sub>E30</sub> – 20,44 мг.

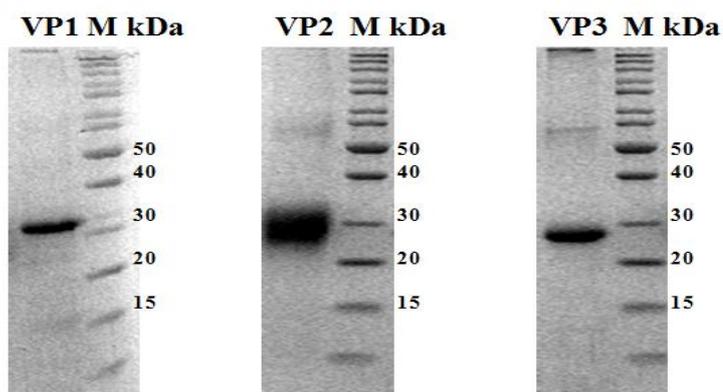


Рисунок 7 – Электрофореграмма ренатурированных белков VP1, VP2 и VP3 вируса E30

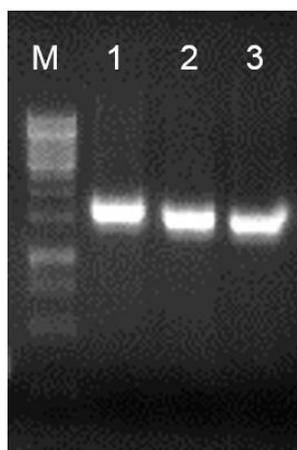
Затем были получены продуценты химерных белков, способных к самосборке в вирусоподобные частицы и содержащих в своем составе фрагмент белка VP1 норовируса и поверхностные белки вируса E30.

Для получения генетической конструкции, позволяющей экспрессировать S домен белка VP1 в *E. coli*, была использована плазмида рЕТ22b+VP1<sub>nor</sub>. Данная плазмида содержит кДНК VP1 норовируса GII.4 с кодонами, адаптированными для экспрессии в *E. coli*, которая находится

под контролем промотора и терминатора бактериофага T7. Плазмида несет сайты узнавания для эндонуклеазы рестрикции HindIII, фланкирующие Р регион белка VP1, что было использовано при выполнении настоящего этапа работы.

Плазмиду pET22b+VP1<sub>nor</sub> расщепляли с использованием рестриктазы HindIII, что приводило к выпадению Р региона белка VP1. Оставшийся фрагмент плазмидной ДНК лигировали и селектировали корректные клоны методами молекулярного клонирования, получив в конечном итоге плазмиду pET22-S<sub>N</sub>.

Для получения плазмид, экспрессирующих химерные белки, проводили перенос генов вируса E30 из плазмид pET22-VP1, pET22-VP2, и pET22-VP3, полученных ранее, в плазмиду pET22-S<sub>N</sub>, несущую последовательность, кодирующую S-домен белка VP1 норовируса. По результатам исследования для каждого из исследуемых генов было отобрано по одному клону, содержащему химерные гены S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>, S<sub>N</sub>-VP2<sub>E30</sub> и S<sub>N</sub>-VP3<sub>E30</sub> в составе плазмид (рисунок 8).



М – маркер молекулярных масс; 1 – S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>(1551 п.о.);  
2 – S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>(1464 п.о.); 3 – S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>(1407 п.о.)

Рисунок 8 – Электрофоретическая подвижность фрагментов ДНК, полученных с помощью ПЦР

Таким образом, были получены плазмиды  $pS_N\text{-VP1}_{E30}$ ,  $pS_N\text{-VP2}_{E30}$ , и  $pS_N\text{-VP3}_{E30}$ , кодирующие слитые в одну молекулу S часть VP1 норовируса и VP1, VP2 или VP3 вируса E30 и находящиеся под контролем промотора и терминатора бактериофага T7. Штаммы-продуценты химерных белков получали путем трансформации клеток *E. coli* Rosetta 2 (DE3) плазмидами  $pS_N\text{-VP1}_{E30}$ ,  $pS_N\text{-VP2}_{E30}$ , и  $pS_N\text{-VP3}_{E30}$ . Клетки затем выращивали и индуцировали экспрессию химерных генов с последующей наработкой химерных рекомбинантных белков.

Для получения очищенных препаратов химерных белков использовали аффинную хроматографию в денатурирующих условиях. Нерастворимую фракцию белков растворяли в буфере содержащем 6М гуанидин гидрохлорида, наносили на колонку, содержащую металл-хелатную сефарозу, промывали и элюировали буферным раствором, содержащим имидазол. После очистки белка проводили ренатурацию полученных химерных белков  $S_N\text{-VP1}_{E30}$ ,  $S_N\text{-VP2}_{E30}$ , и  $S_N\text{-VP3}_{E30}$  путем диализа против буферного раствора, содержащего 50 mM трисHCl, 150 mM NaCl, 20% сахарозы, pH 7,5 (рисунок 9).

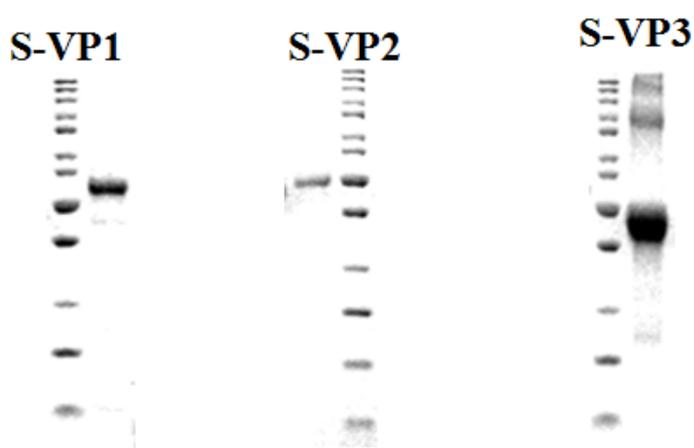
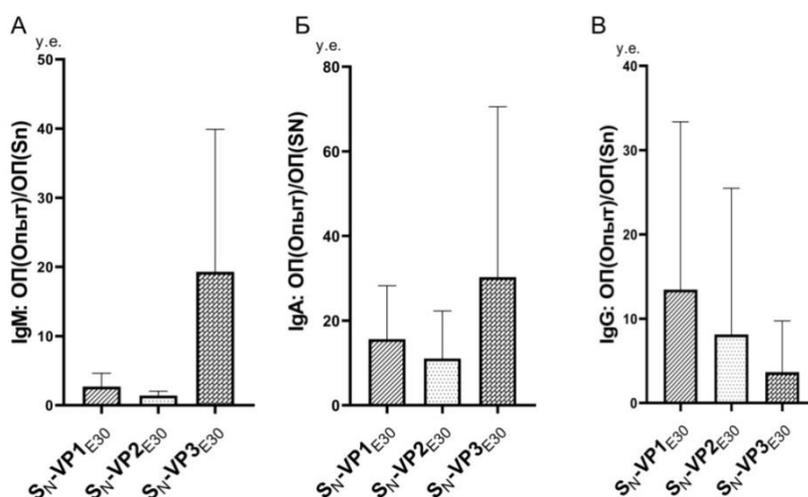


Рисунок 9 – Электрофоретическая подвижность очищенных и ренатурированных химерных белков  $S_N\text{-VP1}_{E30}$ ,  $S_N\text{-VP2}_{E30}$  и  $S_N\text{-VP3}_{E30}$

Конечный выход очищенного с помощью приведенных методов белка  $S_N\text{-VP1}_{E30}$  составил 4,8 мг на 1 литр культуры,  $S_N\text{-VP2}_{E30}$  – 11,1 мг/л,

$S_N$ -VP3<sub>E30</sub> – 3,8 мг/л. Полученные химерные рекомбинантные белки были использованы для оценки их антигенных свойств и способности образовывать вирусоподобные частицы.

Для анализа антигенных свойств химерных белков использовали иммуноферментный метод определения антител к капсидным рекомбинантным белкам E30, а также сформированные ранее панели образцов плазмы крови волонтеров (n=49), в которых не обнаруживались антитела к VP1 норовируса, но присутствовали IgG, IgM и IgA антитела к рекомбинантным белкам VP1, VP2 и VP3 E30. В качестве отрицательного контроля использовали рекомбинантный белок SN, соответствующий S-домену VP1 норовируса.



А – IgM; Б – IgA; В – IgG

Рисунок 10 – Результаты сравнительной оценки взаимодействия рекомбинантных химерных белков с антителами разных классов

Взаимодействие антител участком, соответствующим энтеровирусному фрагменту химерного белка, оценивали путем сравнения оптической плотности реакции (ОП<sub>450</sub>) между опытными образцами и отрицательным контролем (рисунок 10). Обнаружено, что при исследовании наличия антигенных детерминант для антител класса IgG ОП<sub>450</sub> для  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> в среднем превышала отрицательный контроль в 27,7 раза, для  $S_N$ -VP2<sub>E30</sub> – 8,1 раза, для  $S_N$ -VP3<sub>E30</sub> – 3,6 раза. Сравнение

значений ОП<sub>450</sub> для IgM-антител показало, что результаты для S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> были больше в 2,7 раза, для S<sub>N</sub>-VP2<sub>E30</sub> – 1,6 раза, а для S<sub>N</sub>-VP3<sub>E30</sub> – 105,1 раза. При аналогичном сравнении для IgA- антител было установлено, что значения ОП для S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> были больше в 84,8 раз, для S<sub>N</sub>-VP2<sub>E30</sub> – 10,1 раз, а для S<sub>N</sub>-VP3<sub>E30</sub> – 24,5 раз.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что полипептиды VP1, VP2 и VP3 вируса E30, встроенные в состав химерных белков S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>, S<sub>N</sub>-VP2<sub>E30</sub>, и S<sub>N</sub>-VP3<sub>E30</sub>, несут антигенные детерминанты для IgG-, IgM- и IgA-антител к энтеровирусам могут быть использованы в качестве антигена в составе вакцины для профилактики энтеровирусной инфекции, вызванной вирусом ECHO30 человека.

Исследована способность химерных белков S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>, S<sub>N</sub>-VP2<sub>E30</sub>, и S<sub>N</sub>-VP3<sub>E30</sub> к самосборке с образованием ВпЧ. Для этого проводили электронно-микроскопическое исследование растворов белков.

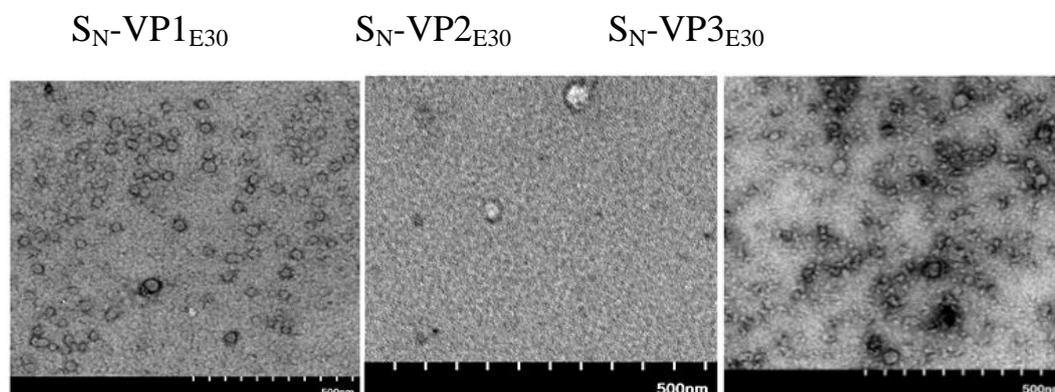


Рисунок 11 – Электронно-микроскопические фотографии ВпЧ, образованных белками S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>, S<sub>N</sub>-VP2<sub>E30</sub> и S<sub>N</sub>-VP3<sub>E30</sub>

Обнаружено, что каждый химерный белок образовывал полые сферические вирусоподобные частицы, размер которых варьировал от 30 до 60 нм (рисунок 11).

Таким образом, были получены клетки *E. coli*, продуцирующие химерные белки, состоящие из S домена белка VP1 норовируса, слитого

с VP1, VP2 или VP3 белками E30, а также исследована эффективность продукции таких белков. Были получены плазмиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие S-домен белка VP1 норовируса, и слитые с последовательностями, кодирующими белки VP1 или VP2 или VP3 вируса E30. Трансформированные такими плазмидами клетки *E. coli* продуцировали химерные белки, построенные из S-домена VP1 норовируса и VP1 или VP2 или VP3 белков вируса E30. Белки были очищены в препаративных количествах. Было показано, что они взаимодействуют с антителами человека против белков вируса E30, сохраняя антигенные свойства, характерные для вирусных белков. С помощью электронной микроскопии, продемонстрировано, что полученные химерные белки образуют вирусоподобные частицы. То есть, полученные химерные белки могут быть использованы в качестве антигенной составляющей прототипа вакцины для профилактики инфекции, вызываемой вирусом E30.

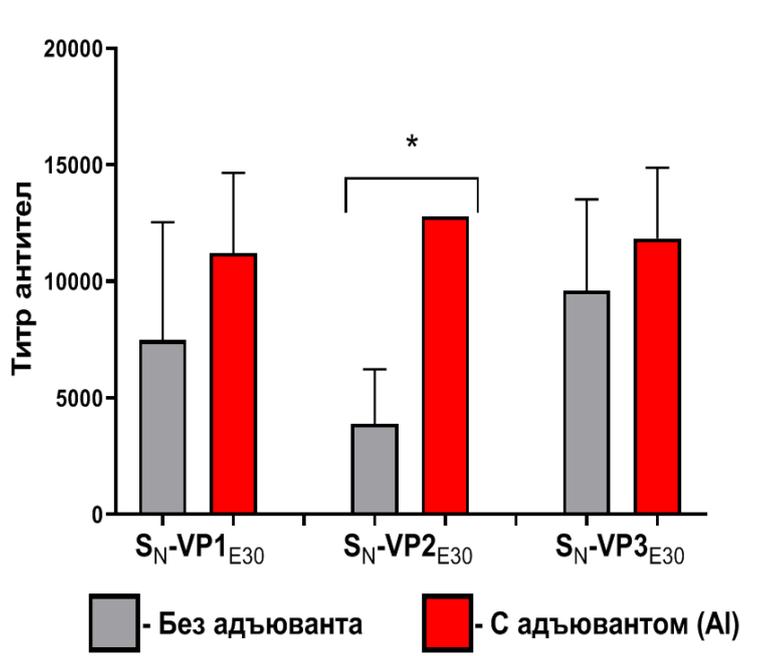


Рисунок 12. Обратные титры антител у иммунизированных мышей BALB/c

Наработанные в препаративных количествах и очищенные рекомбинантные белки были использованы для иммунизации мышей линии BALB/c. Мышам вводили 10 или 100 мкг каждого из

рекомбинантных белков в присутствии 100 мкг гидроокиси алюминия или без нее и через три недели оценивали гуморальный иммунный ответ на введенные белки. Как следует из рисунка 12, в ответ на введение химерных белков развивался антительный ответ как при иммунизации в присутствии адьюванта, так и без адьюванта. Титры антител, как правило, превышали величину, равную 1:500. При этом введение адьюванта, как и ожидалось, обеспечивало более высокий ответ. У отдельных мышей титр антител достигал величин, равных 1:100 000.

Таким образом, проведенные работы позволили создать прототип кандидатной рекомбинантной химерной вакцины для профилактики инфекции, вызываемой вирусом E30.

## Заключение

Вакцинация является одним из самых важных средств контроля за здоровьем человека и способом предупреждения опасных для жизни инфекционных заболеваний. Применение вакцин ежегодно спасает примерно от 2 до 3 миллионов жизней. Разработавший принципы вакцинации Луи Пастер является в связи с этим одним самых великих людей, живших на Земле за всю историю человечества. Затраты на вакцинацию значительно меньше социально-экономического ущерба, наносимого заболеваниями, в том числе затрат на лечение больных.

Прогресс в области молекулярной биологии, иммунологии, инфекционных болезней, микробиологии и вирусологии, и стремительное развитие, в связи с этим, биологических технологий, и в первую очередь генной инженерии, оказал значительное влияние на развитие вакцинологии. Появилось множество различных подходов к созданию вакцин. Основное влияние на прогресс в этой области оказала генная инженерия. В настоящее время создано множество новых технологических платформ для конструирования эффективных вакцин и большинство вновь созданных технологий получения вакцин основано на использовании разных вариантов генной инженерии. Большое разнообразие инфекционных агентов, опасных для здоровья человека и животных привело к множеству различных разработок.

В настоящей монографии сделана попытка обобщения генно-инженерных технологий создания вакцин для профилактики кишечных инфекций и энтеровирусных нейроинфекций, вызываемых такими группами инфекционных агентов как ротавирусы, норовирусы, энтеровирусы. Отдельным разделом представлена информация о разрабатываемых вакцинах для профилактики хеликобактерной инфекции. Приводятся механизмы развития иммунологической памяти, лежащей в основе эффективного иммунного ответа и защитного эффекта при повторной встрече с патогеном. Описаны разнообразные приемы усиления с помощью адъювантов защитного

иммунитета в ответ на вакцинацию. Рассмотрены вопросы, связанные с разработкой разного рода мукозальных вакцин, в том числе пероральных и интраназальных вакцин. Ставится акцент на используемой авторами технологической платформе, основанной на вирусоподобных частицах. Кроме того, детально рассмотрены вопросы применения генно-инженерных технологий для получения гликонъюгированных антибактериальных вакцин. Одним из таких новых направлений является метод биологической конъюгации или технология рекомбинантного бактериального гликозилирования. Технология применима для конструирования широкого спектра антибактериальных вакцин, в том числе и для профилактики особо опасных бактериальных кишечных инфекций.

Завершается монография описанием двух авторских разработок прототипов генно-инженерных вакцин, основанных на использовании химерных рекомбинантных белков, способных формировать вирусоподобные частицы, инициирующие специфический иммунный ответ на инфекционные агенты. Авторами сконструированы прототипы рекомбинантных (генно-инженерных) вакцин для профилактики норовирусной инфекции и вирусного менингита, вызываемого энтеровирусом E-30.

*Научное издание*

**Новиков В.В., Цыганова М.И., Новиков Д.В., Мохорова Е.В.,  
Мелентьев Д.А., Лапин В.А., Зайцев Д.Е.**

**Генно-инженерные вакцины  
для профилактики инфекционных  
заболеваний**

*Монография*

*Печатается в авторской редакции*

*Усл. печ. листов 19,01. Тираж 500 экз.*

---

Издание и печать «Издательство Дятловы горы»

Нижний новгород, ул. Маршала Казакова 65А

Тел. +7-920-234-94-35

