

© Н.Н.ОВЕЧКО, Н.Е.ЯСТРЕБОВА, 2017

Н.Н.Овечко, Н.Е.Ястребова

АНТИГЕНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КАНДИДАТ-ВАКЦИНЫ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Несмотря на то, что вакцина против *Haemophilus influenzae* b (Hib) давно и успешно применяется, получение вакцины против нетипируемых штаммов *Haemophilus influenzae* (NTHi) находится только в стадии разработки. Сложности этой работы обусловлены отличительными чертами NTHi по сравнению с Hib: отсутствие полисахаридной капсулы, высокий уровень антигенной гетерогенности и особенности развития патогенеза, который включает распространение по организму со слизистых оболочек дыхательных путей. В настоящее время с целью создания вакцины активно проводятся исследования 15 поверхностных структур NTHi. Среди них белки PE, P2, P6, PD, пузырьки поверхности мембраны (OMVs) и другие. Практическое применение в настоящее время получил лишь белок PD, который был использован в качестве носителя с антигенной функцией в конъюгированных полисахаридных вакцинах против пневмонии (Prevenar; PHiD-CV). Вакцинация этими препаратами позволила снизить общую заболеваемость острым отитом у детей на 33 — 52%. Однако этот результат не может рассматриваться как окончательный, поэтому исследования и апробирование кандидат-вакцин продолжаются.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 82—90

Ключевые слова: нетипируемые штаммы *Haemophilus influenzae*, поверхностные структуры, гетерогенные штаммы, кандидат-вакцины

N.N.Ovechko, N.E.Yastrebova

ANTIGENS OF SURFACE STRUCTURES OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* AS PERSPECTIVE VACCINE-CANDIDATES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Despite long and successful use of *Haemophilus influenzae* b (Hib) vaccine, production of the vaccine against non-typed strains of *Haemophilus influenzae* (NTHi) is only being developed. Difficulties of this work are determined by features of NTHi compared with Hib: lack of polysaccharide capsule, high level of antigenic heterogeneity and specialties of pathogenesis development that includes spread through the organism from mucosa of the respiratory tract. Currently, 15 surface structures of NTHi are being actively studied with the aim of creating the vaccine. PE, P2, P6, PD proteins, outer membrane vesicles (OMVs) and others are among them. Only PD protein currently has practical application, that was used as a carrier with antigenic function in conjugated polysaccharide vaccines against pneumonia (Prevenar; PHiD-CV). Vaccination with these preparations allowed to reduce the total morbidity with acute rhinitis on children by 33 — 52%. However, this result can not be examined as final, thus, research and approbation of the vaccine-candidates continues.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 82—90

Key words: non-typed strains of *Haemophilus influenzae*, surface structures, heterogenic strains, vaccine candidates

Нетипируемые штаммы *Haemophilus influenzae* (NTHi) — это грам-отрицательные коккобактерии, входящие в состав синантропной флоры верхних дыхательных путей человека, которые способны вызывать широкий спектр инвазивных и локальных заболеваний как у детей, так и у взрослых.

Одним из препятствий на пути создания вакцины против бактерий NTHi является высокий уровень гетерогенности штаммов и отсутствие полисахаридной оболочки у микроорганизмов этой группы. В обзоре приведены данные о развитии исследований в области создания эффективной вакцины и, в частности, о проблеме поиска наиболее эффективной антигенной структуры с высокой степенью консервативности.

С момента введения капсульной полисахаридной конъюгированной вакцины против *Haemophilus influenzae* b (Hib) в конце 1980-х годов во многих развитых странах произошло резкое снижение количества заболеваний, вызванных этим микроорганизмом [24]. Однако эта вакцина не оказала никакого влияния на инфекции, вызванные NTHi, и в настоящее время инвазивные заболевания, вызванные NTHi, продолжают постоянно регистрироваться, а их относительная доля увеличивается. В связи с таким изменением эпидемиологической картины и повышением уровня смертности от заболеваний, вызванных NTHi, появился высокий спрос на эффективные вакцины, защищающие от этой инфекции. Задачей более высокого уровня может стать поиск одного или нескольких антигенов, иммунизация которыми приводила бы к стойкому иммунитету как против инфекции, вызванной Hib, так и гетерогенными штаммами NTHi, отличающимися высоким уровнем сероконверсии в зависимости от региона распространения.

Разработка вакцины против NTHi требует решения новых задач, которые не возникали при создании вакцины от заболеваний, вызванных Hib, так как эти две группы микроорганизмов наделены существенными для разработки вакцины отличиями: 1. Штаммы NTHi не имеют полисахаридной капсулы, что приводит к необходимости поиска новых протективных антигенов; 2. NTHi-штаммы проявляют высокий уровень гетерогенности, которая выражается в большом разнообразии структуры поверхностных антигенов [13,29] и, следовательно, приводит к необходимости поиска высоко консервативных компонентов, обладающих антигенными свойствами; 3. Штаммы типа Hib распространяются в организме гематогенным путем, в то время как патогенез инфекций, вызванных штаммами NTHi, включает распространение бактерий в организме при попадании на слизистую оболочку дыхательных путей.

Следовательно, новая вакцина должна эффективно индуцировать, кроме IgG, IgA.

Идеальный антиген для создания вакцины должен быть консервативным среди всего многообразия штаммов, характеризоваться поверхностным расположением и обилием эпитопов на мембране бактериальной клетки, а также индуцировать защитный иммунный ответ на высоком уровне.

В настоящее время перспективными кандидат-вакцинами могут считаться антигены, указанные в табл. [26].

Наиболее ранние исследования были сфокусированы на поиске поверхностных антигенов, содержащих полисахаридный компонент, так как способность этих молекул бактериальной мембраны вызывать специфический иммунитет многократно подтверждена эффективностью современных поли-

Антигены NTHi, с которыми проводятся исследования в настоящее время

Антиген	Молекулярная масса (кДа)	Функция
Белок адгезин (Hap)	~155	Адгезин
Высокомолекулярные белки адгезии (HMW1, HMW2)	120—125	Адгезины
Большой адгезин (Hia)	~115	Адгезин
Белок D5	~80	Нуклеотидилтрансфераза
Белок (HtrA)	~46	Белок теплового шока
Белок P2	36—42	Порин
Белок (липопротеин) D	~42	Глицерофосфодиэстераза
Белок P5 (fimbrin)	27—35	Адгезин, белок внешней мембраны
Белок P4	~30	Кислая фосфатаза
Белок F	~30	Адгезин с АТФ-связывающей функцией
Белок внешней мембраны (OMP) 26	~26	Белок транслокации
Белок P6	~16	Пептидогликана-связанный липопротеин
Белок E	~16	Адгезин
Пили (тип IV)	~14	Адгезин
Детоксицированный липоолигосахарид	3—5	Эндотоксин

сахаридных вакцин (например, вакцина для профилактики пневмококковой инфекции и другие).

В экспериментах по изучению иммуногенности липоолигосахарида (ЛОС) конъюгированного со столбнячным анатоксином, удалось показать, что вакцинация шиншилл такими препаратами достоверно в более чем на 40% защищает животных от острого среднего отита (ОСО) при экспериментальном заражении. Иммуитет у животных формировался за счет индукции антител класса G, M и A как в сыворотке крови, так и в физиологической жидкости среднего уха [38]. Дальнейшая работа с конъюгатом ЛОС — столбнячный анатоксин включала изучение иммуногенности и безопасности препарата для здоровых взрослых людей. Результаты исследований показали, что в крови у всех волонтеров появились антитела класса G к ЛОС. У 52,5% испытуемых наблюдался более чем четырехкратный рост титра антител после двух инъекций. Через 38 недель среднегеометрический показатель уровня IgG анти-ЛОС был по-прежнему выше, чем до первой инъекции. Аналогичная картина реактивности наблюдалась для IgA и IgM анти-ЛОС [16].

С целью дальнейшего усовершенствования препарата на основе ЛОС в качестве белка-носителя был использован наружный мембранный белок NTHi P6, что предполагало усиление потенциала иммуногенности конъюгата. Исследования выполнялись на лабораторных животных, и полученные данные позволили сделать вывод о том, что конъюгаты ЛОС-P6 вызывают специфические иммунные реакции, а белок P6 может служить эффективным носителем для ЛОС или других молекул углеводов [39].

Однако дальнейшего продолжения работы по изучению ЛОС как перспективного препарата для вакцинации не получили, а подавляющее большинство исследований в настоящее время направлено на обнаружение консервативной белковой структуры NTHi.

Решающим фактором патогенеза *H. influenzae* предполагается механизм первоначальной адгезии на слизистые оболочки дыхательных путей. Если бактериальная клетка преодолевает мукоцилиарный поток и соприкасается с эпителием, создаются условия для начала колонизации и дальнейшего повреждения эпителиальных клеток. Следствием этих процессов будет распро-

странение воспаления как на поверхностном слое, так и в глубокие ткани [23]. Как правило, *H. influenzae* осуществляет адгезию с помощью многочисленных белков-адгезинов, расположенных на поверхности мембраны, в том числе с участием автотранспортеров [29], что дает основание для изучения и апробирования адгезинов в качестве перспективных кандидат-вакцин.

Выделенный и охарактеризованный белок E (PE) с мол. массой 16 кДа относится к таким адгезинам [32]. Регион, кодирующий участок белка, ответственный за связывание с эпителием, обязательно полностью сохраняется у различных штаммов, и ген PE характеризуется высоким уровнем консервативности как среди NTHi, так и среди инкапсулированных штаммов — Hib [36]. Идентичность последовательности находится на уровне 96,9 — 100% без учета последовательностей, кодирующих сигнальные пептиды, а область связывания (аминокислоты 84 — 108) с эпителиальными клетками присутствовала во всех исследованных образцах. Важно отметить, что PE экспрессировался во всех исследованных образцах NTHi (126 изолятов), независимо от фазы роста, в 98,4% случаев. Филогенетический анализ последовательности PE позволил разделить виды *Haemophilus* на 2 отдельных кластера. Изоляты Hib относились к 1 кластеру, а NTHi присутствовали в обоих. Далее было установлено, что самый важный для активного связывания с эпителиальными клетками домен PE (84 — 108 аминокислоты) необходим для связывания с молекулами полифункционального гликопротеина крови и внеклеточного матрикса — витронектина [17]. Несколько позже в экспериментах с мутантами NTHi было установлено, что PE одновременно связывает не только витронектин, но и другие физиологически важные молекулы, в том числе гликопротеин базальной мембраны — ламинин, что определяет многофункциональный характер PE как адгезина [18, 35]. В экспериментах, проведенных на мышах, иммунизированных фрагментом PE (84 — 108), было показано, что животные переносили экспериментальное заражение NTHi в значительно более легкой форме, по сравнению с животными в группе контроля [32].

Другая группа перспективных антигенов относится к белкам внешней мембраны бактерий, которые формируют каналы диффузии и позволяют небольшим полярным молекулам проникать внутрь клетки и привлекают внимание создателей вакцин по многим причинам. Эти белки — порины, являются основными компонентами внешней оболочки грамотрицательных бактерий, и *H. influenzae* в том числе. Внешняя оболочка этих микроорганизмов содержит от шести до восьми основных белков [3, 25] из которых наибольшая часть представлена белком P2. Такое распределение справедливо как для NTHi, так и для Hib [9].

Порины играют важную роль в бактериальном патогенезе и участвуют в обеспечении процессов присоединения бактериальной клетки, инвазии и устойчивости к сывороточным факторам иммунитета. Значительный прогресс в понимании функции поринов произошел после определения кристаллической структуры ряда белков этой группы [33, 39]. Было показано, что они представляют собой тример, в котором каждый мономер, как правило, представлен в виде 16 антипараллельных β -нитей, пересекающих внешнюю мембрану. На поверхности клеток располагается восемь петель, они крупные, их длина варьирует, периплазматически расположено восемь коротких изгибов (короткие петли). Во всех случаях сечение пор ограничивается одной большой петлей L3, которая уходит в канал и сужает его, что определяет размер поры,

ее физиологические свойства, проводимость. Сравнение последовательности генов, кодирующих P2, показали, что трансмембранные области этого белка относительно консервативны. В то же время, существует значительная неоднородность в участках, кодирующих область внешнего участка петли [2, 4, 11]. Далее было показано, что наибольшую стимуляцию антителообразования к NTHi определяла петля L5, которая, как считается, содержит штамм-специфичные иммунодоминантные эпитопы. Приведенные выше данные и результаты других исследований позволили заключить, что порин P2 NTHi является одним из лучших вакцин-кандидатов, с точки зрения его функциональных характеристик [40].

Продолжая работы в этом направлении, Cantisani M. et al. [7] определили пептиды комплементарные последовательности одной из петель (L7) P2, которые могут быть использованы для блокирования деятельности поринов. По мнению авторов, эта стратегия может представлять собой новый подход для разработки антибактериальных препаратов в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий.

Следующая группа широко исследуемых антигенов — это везикулы внешней мембраны (OMVs), которые являются продуктом естественной секреции грамотрицательных бактерий. Они возникают, когда части наружной мембраны выпячиваются и образуется перетяжка. В результате появляются сферические (двуслойные) пузырьки. Размер пузырьков варьирует от 10 до 300 нм в диаметре, а их состав представлен, в основном, компонентами наружной мембраны, такими как фосфолипиды, ЛПС или ЛОС. Кроме того, OMVs содержат перипластические компоненты, которые попадают в просвет мембраны в процессе выпячивания и образования везикул [22]. Таким образом, в составе везикул находятся многочисленные компоненты бактериальной клетки, бактериальные антигены [30]. Гетерогенный состав везикул обеспечивает мультииммуногенность и адьювантные свойства, что выделяет их из ряда антигенов, которые используются для разработки вакцин [21]. Наибольший успех был достигнут в работах с использованием OMVs, полученных из *Neisseria meningitidis*. В результате была создана эффективная и безопасная вакцина, которая широко используется в нескольких странах [34], [Holst J. et al., 2009].

Получение препарата OMVs из *H. influenzae* (штамм 86-028NP) было впервые описано для некапсулированного серотипа d еще в 1982 году [8]. В его составе было обнаружено 142 белка. Среди них: гема-утилизирующий белок, защитный поверхностный антиген D15, трансферин-связывающие белки, белки внешней мембраны (P1, P2, P5 и P6), обладающие высоким иммуногенным потенциалом [37]. Данные, полученные в современных экспериментах, позволили убедиться в том, что OMVs многих штаммов NTHi имеют аналогичный состав белков. На основании такой информации возникает необходимость решать вопрос о целесообразности поиска одного антигена в случае, когда можно использовать для иммунизации сочетание нескольких компонентов, так как поликомпонентный препарат способен существенно повысить эффективность вакцины против гетерогенных штаммов NTHi. Позитивные результаты экспериментов по изучению эффективности интраназальной вакцинации мышей открывают хорошие перспективы для использования OMVs и позволяют рассматривать препарат в качестве нового перспективного вакцин-кандидата [Sandro Roier et al., 2012].

Несмотря на то, что использование нескольких антигенов для получения иммуногенного профилактического препарата имеет весомые основания, наибольшую степень развития в настоящее время получило производство вакцин, конъюгированных с белком (липопротеином) D (PD). Результаты исследования 127 штаммов *H. influenzae*, среди которых были инкапсулированные штаммы серотипов a — f, позволили сделать вывод о том, что PD является видоспецифичным, так как был обнаружен во всех исследованных образцах [1]. Расположение на поверхности бактерий и существенное количество (2800 молекул на бактериальную клетку) делает этот белок привлекательным кандидатом для получения вакцины.

В результате анализа области генома, кодирующей PD, удалось определить, что последовательность гена имеет протяженность 1092 нуклеотидных основания и несет информацию для синтеза белковой молекулы, содержащей 346 аминокислот с расчетной молекулярной массой 41,821 дальтона [20]. О высокой консервативности нуклеотидной последовательности гена PD можно судить по результатам исследования 14 штаммов *H. influenzae* [14]. Идентичность нуклеотидной последовательности превышала 97%, идентичность аминокислотной последовательности была на таком же высоком уровне. Однако штаммы, выделенные от пациентов с хроническим бронхитом, характеризовались ограниченным дрейфом последовательности, кодирующей ген PD [12, 19].

Кроме NTHi, ведущим бактериальным патогеном, вызывающим ОСО, является *Streptococcus pneumoniae*. Эти два возбудителя также признаны основной причиной инфекции нижних дыхательных путей. Поэтому использование антигенов NTHi в составе вакцины против инфекций, вызванных пневмококком, представляется достаточно рациональным решением. Вакцины, в составе которых использовался только обычный капсульный полисахарид *S. pneumoniae*, применялись в течение многих десятилетий, но они создавали недостаточный иммунитет у детей. Созданная позже вакцина, содержащая полисахариды 7 серотипов *S. pneumoniae* (препарат Prevenar; Wyeth), конъюгированные с белком CRM197 (нетоксичный мутант дифтерийного токсина), обладает высоким уровнем иммуногенности у детей в отношении инвазивных пневмококковых заболеваний, а также демонстрирует умеренную эффективность против ОСО, вызванного серотипами, использованными для приготовления пневмококковой вакцины [5]. Недостаток этой вакцины заключался в том, что использованный для ее получения белок-носитель CRM197 применяется и для производства вакцины против Hib, и для получения менингококковой конъюгированной вакцины. Многократная вакцинация одним и тем же белком-носителем в данном случае является неоправданной и вызывает опасения, так как может оказать негативное влияние на иммуногенность других конъюгированных вакцин, которые вводятся одновременно с пневмококковой конъюгированной вакциной [6]. Для исключения возможных негативных явлений при вакцинации необходимо использовать другие белки-носители. Наиболее перспективным среди кандидатов на роль такого белка представлялся PD, так как был достаточно охарактеризован и отличался поверхностной локализацией, высокой степенью консервативности и патогенности. Доклинические результаты экспериментов с этим белком также подтверждали его перспективность [15, 28]. Учитывая вышесказанное, PD в неацилированной форме как белок-носитель с анти-

генным потенциалом был использован для производства новой 11-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины. В результате удалось получить вакцину, обладающую двойным защитным действием: против *S. pneumoniae* и NTHi. Иммуногенность и безопасность новой 11-валентной пневмококковой вакцины с PD как носителем были испытаны в рандомизированном, контролируемом исследовании с участием 154 здоровых детей [27]. Вакцинация проводилась в возрасте 2, 4, 6 месяцев и в возрасте 12 — 15 месяцев. Концентрация антител к пневмококку после введения первых 3 доз варьировала от 1,26 до 4,92 мкг/мл, в зависимости от серотипа и группы детей. На основании этих данных был сделан вывод, что PD-конъюгированная пневмококковая вакцина иммуногенна и обеспечивает защиту детей на достаточно высоком уровне.

В следующем рандомизированном двойном слепом исследовании [31] была изучена возможность применения этой пневмококковой полисахаридной вакцины для предупреждения ОСО, вызванного как *S. pneumoniae*, так и NTHi. Анализ показал, что PD-конъюгированная вакцина значительно снижала (33,6%) общую заболеваемость ОСО. Эффективность вакцинации против ОСО, вызванного микроорганизмами тех серотипов, которые были использованы при изготовлении вакцины, составила 52,6 — 57,6% (для *S. pneumoniae*) и 35,3% (для NTHi). При этом увеличения заболеваемости ОСО, вызванной пневмококками не использованных для изготовления вакцины серотипов или других бактериальных патогенов, не наблюдалось.

Другая пневмококковая полисахаридная PD-конъюгированная вакцина (PHiD-CV; Synflorix) содержит капсульные полисахариды, полученные из бактерий десяти серотипов *S. pneumoniae*. Восемь из них конъюгированы с PD, лишенным липидного компонента, а два других конъюгированы либо со столбнячным, либо с дифтерийным анатоксином. Троекратная первичная вакцинация детей в возрасте до 6 месяцев PHiD-CV вызвала высокий иммунный ответ на все серотипы пневмококков, использованных для получения вакцины. Кроме того, при исследовании опсонофагоцитарной активности были обнаружены функциональные антитела против всех серотипов.

Четвертую вакцинацию PHiD-CV делали на втором году жизни детей. Она вызвала анамнестический ответ на все десять серотипов пневмококка. При одновременном назначении конъюгата серогруппы С менингококка или пентавалентной цельноклеточной коклюшной комбинированной вакцины, а также вакцины против полиомиелита, применяемых по двум различным графикам первичной вакцинации, результирующая иммуногенность PHiD-CV клинически значимо не изменялась.

11Pn-PD — прототип 11-валентной PHiD-CV вакцины продемонстрировал защитные свойства от эпизодов острого отита среднего уха, вызванного *S. pneumoniae* и NTHi у младенцев в возрасте до 27 месяцев. Число впервые возникших эпизодов острого отита, вызванных серотипами бактерий, которые использовались при получении вакцины, у привитых препаратом 11Pn-PD сократилось на 52,6% по сравнению с детьми, иммунизированными контрольной вакциной. Переносимость PHiD-CV, в целом, была сопоставима с реакцией на 7vCRM [10].

До настоящего времени задача создания высокоэффективной вакцины против инфекций, вызванных многочисленными гетерогенными штаммами NTHi, остается актуальной. Применение PD в качестве белка-носителя с

антигенным потенциалом для получения конъюгированных вакцин в определенной мере решило эту задачу и позволило частично предотвращать эпизоды ОСО у детей. Этот результат создает оптимистичный фон для продолжения исследований, в том числе, работ по изучению других антигенов NTHi.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akkoyunlu M., Ruan M., Forsgren A. Distribution of protein D, an immunoglobulin D-binding protein, in *Haemophilus* strains. *Infect. Immun.* 1991, 59: 1231-1238.
2. Arbing M. A., Hanrahan J. W., Coulton J. W. Mutagenesis identifies amino acid residues in extracellular loops and within the barrel lumen that determine voltage gating of porin from *Haemophilus influenzae* type b. *Biochemistry.* 2001, 40: 14621-14628.
3. Barenkamp S.J., Jr., Munson R.S., Granoff D.M. Outer membrane protein and biotype analysis of pathogenic nontypable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 1982, 36: 535-540.
4. Bell J., Grass S., Jeanteur D. Diversity of the P2 protein among nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Infect. Immun.* 1994, 62: 2639-2643.
5. Black S., Shinefield H., Fireman B. et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19: 187.
6. Burrage M., Robinson A., Borrow R. et al. Effect of vaccination with carrier protein on response to meningococcal C conjugate vaccines and value of different immunoassays as predictors of protection. *Infect. Immun.* 2002, 70: 4946-4954.
7. Cantisani M., Vitiello M., Falanga A. et al. Peptides complementary to the active loop of porin P2 from *Haemophilus influenzae* modulate its activity. *Int. J. Nanomedicine.* 2012, 7: 2361-2371.
8. Concino M.F., Goodgal S.H. DNA-binding vesicles released from the surface of a competence-deficient mutant of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 1982, 152: 441-450.
9. Coulton J.W., Chin A.C., Vachon V. Recombinant porin of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect. Dis.* 1992, 165 (Suppl.): 188-191.
10. Croxtall J.D., Keating G.M. Pneumococcal polysaccharide protein D-conjugate vaccine (Synflorix; PHiD-CV). *Paediatr. Drugs.* 2009, 11 (5): 349-357.
11. Druim B., Dankert J., Jansen H.M. et al. Genetic analysis of the diversity in outer membrane protein P2 of non-encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Microb. Pathog.* 1993, 14: 451-462.
12. Duim B., Ruiters P., Bowler L.D. et al. Sequence variation in the hpd gene of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* isolated from patients with chronic bronchitis. *Gene.* 1997, 191: 57-60.
13. Erwin A.L., Smith A.L. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* 2007, 15: 355-362.
14. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 1995, 269: 496-512.
15. Forsgren A., Riesbeck K., Janson H. Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable H. influenzae antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46 (5): 726-731.
16. Gu X.X., Rudy S.F., Chu C. et al. Phase I study of a lipooligosaccharide-based conjugate vaccine against nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Vaccine.* 2003, 21 (Issues 17-18): 2107-2114.
17. Hallström T., Blom A.M., Zipfel P.F. et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J. Immunol.* 2009, 183 (4): 2593-2601.
18. Hallström T., Singh B., Resman F. et al. *Haemophilus influenzae* protein E binds to the extracellular matrix by concurrently interacting with laminin and vitronectin. *J. Infect. Dis.* 2011, 204 (7): 1065-1074.
19. Harrison A., Dyer D.W., Gillaspay A. et al. Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with H. influenzae serotype d, strain KW20. *J. Bacteriol.* 2005, 187: 4627-4636.
20. Janson H., Hedén L.O., Grubb A. et al. Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*: cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1991, 59: 119-125.

21. Kim S.H., Kim K.S., Lee S.R. et al. Structural modifications of outer membrane vesicles to refine them as vaccine delivery vehicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, 1788: 2150-2159.
22. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010, 64: 163-184.
23. Lysenko E.S., Ratner A.J., Nelson A.L. et al. The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog.* 2005, 1 (1): e1.
24. Morris S.K., Moss W.J., Halsey N. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine use and effectiveness. *Lancet. Infect. Dis.* 2008, 8: 435-443.
25. Murphy T. F., Dudas K. C., Mylotte J. M. et al. A subtyping system for nontypable Haemophilus influenzae based on outer-membrane proteins. *J. Infect. Dis.* 1983, 147: 838-846.
26. Murphy T.F. Vaccines for nontypeable Haemophilus influenzae: the Future is now. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015, 22 (5): 459-466.
27. Nurkka A., Joensuu J., Henckaerts I. et al. Immunogenicity and safety of the eleven valent pneumococcal polysaccharide-protein D conjugate vaccine in infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004, 23: 1008-1014.
28. Pichichero M.E., Kaur R., Casey J.R. et al. Antibody response to Haemophilus influenzae outer membrane protein D, P6, and OMP26 after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children. *Vaccine.* 2010, 28 (44): 7184-7192.
29. Poolman J.T., Bakaletz L., Cripps A. et al. Developing a nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) vaccine. *Vaccine.* 2000, 19 (Suppl 1): 108-115.
30. Post D.M., Zhang D., Eastvold J.S. et al. Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from Neisseria meningitidis serogroup B. *J Biol. Chem.* 2005, 280: 38383-38394.
31. Prymula R., Peeters P., Chrobok V. et al. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both Streptococcus pneumoniae and non-typable Haemophilus influenzae: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet.* 2006, 367: 740-748.
32. Ronander E., Brant M., Eriksson E. et al. Nontypeable Haemophilus influenzae adhesin protein E: characterization and biological activity. *J. Infect. Dis.* 2009, 199: 522-531.
33. Saint N., Lou K. L., Widmer C. et al. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 20676-20680.
34. Sexton K., Lennon D., Oster P. et al. The New Zealand meningococcal vaccine strategy: a tailor-made vaccine to combat a devastating epidemic. *N. Z. Med. J.* 2004, 117: 1015.
35. Singh B., Jalalvand F., Mörgelin M. et al. Haemophilus influenzae protein E recognizes the C-terminal domain of vitronectin and modulates the membrane attack complex. *Mol. Microbiol.* 2011, 81 (1): 80-98.
36. Singh B., Brant M. et al. Protein E of Haemophilus influenzae is a ubiquitous highly conserved adhesin. *J. Infect. Dis.* 2010, 201 (3): 414-419.
37. Sharpe S.W., Kuehn M.J., Mason K.M. Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable Haemophilus influenzae. *Infect. Immun.* 2011, 79: 4361-4369.
38. Sun J., Chen J., Cheng Z. et al. Biological activities of antibodies elicited by lipooligosaccharide based-conjugate vaccines of nontypeable Haemophilus influenzae in an otitis media model. *Vaccine.* 2000, 18 (Issue 13): 1264-1272.
39. Wu T., Chen J., Murphy T.F. et al. Investigation of nontypeable Haemophilus influenzae outer membrane protein P6 as a new carrier for lipooligosaccharide conjugate vaccines. *Vaccine.* 2005, 23 (Issue 44): 5177-5185.
40. Yi K., Murphy T. F. Importance of an immunodominant surface-exposed loop on outer membrane protein P2 of nontypeable Haemophilus influenzae. *Infect. Immun.* 1997, 65: 150-155.

Поступила 17.11.16

Контактная информация: Овечко Николай Николаевич, к.б.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-07-41