

© И.Б.СЕМЕНОВА, Н.А.МИХАЙЛОВА, 2016

*И.Б.Семенова, Н.А.Михайлова*

## СЕРОТИПНЕЗАВИСИМЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

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

Создание серотипнезависимых вакцин включает в себя четыре направления — конструирование белковых вакцин на основе рекомбинантных белков пневмококка, цельноклеточных убитых и аттенуированных вакцин, ДНК-вакцин и использование белков *Streptococcus pneumoniae* в качестве носителя для полисахаридных и конъюгированных вакцинных препаратов. Наиболее широко изученными являются белковые вакцины. У пневмококка описано около 20 белков — внутриклеточные, связанные с клеточной стенкой и секретируемые. Большинство исследователей останавливаются на конструировании вакцинного препарата, включающего набор нескольких белков, защищающих от колонизации, инвазии, пневмонии. Механизм действия белковых вакцин отличается от такового полисахаридных. Белковые препараты создают защиту от нескольких серотипов пневмококка. Актуальным для доклинических испытаний является исследование перекрестной активности белков-кандидатов в вакцинные препараты с тканями организма человека. Для вакцин из белков пневмококка необходимо подобрать адьюванты, так как гидроксид алюминия не является подходящим адьювантом для этих препаратов.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 76—85

Ключевые слова: серотипнезависимые вакцины, пневмококк, белки пневмококка, адьюванты вакцин

*I.B.Semenova, N.A.Mikhailova*

## SEROTYPE-INDEPENDENT VACCINES AGAINST PNEUMOCOCCAL INFECTION

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Creation of serotype-independent vaccines includes 4 directions — construction of protein vaccines based on recombinant pneumococcus proteins, whole-cell killed or attenuated vaccines, DNA-vaccines and use of *Streptococcus pneumoniae* as a carrier for polysaccharide and conjugated vaccine preparations. Protein vaccines are the most widely studied. Around 20 proteins are described for pneumococcus — intracellular, associated with cell wall and secreted. The majority of researchers stop at construction of a vaccine preparation including a set of several proteins, protecting from colonization, invasion, pneumonia. Mechanism of action for protein vaccines differs from that of polysaccharide vaccines. Protein preparations create protection from several pneumococcus serotypes. Study of cross-activity of protein-candidates for vaccine preparations with human organism tissues is actual for preclinical studies. Selection of adjuvants is necessary for these vaccines, because aluminium hydroxide is not a suitable adjuvant for these preparations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 76—85

Key words: serotype-independent vaccines, pneumococcus, pneumococcus proteins, vaccine adjuvants

Для профилактики носительства и заболеваний, индуцированных *Streptococcus pneumoniae*, применяются полисахаридные и конъюгированные вакцины. К ним относятся представленные на рынке, в том числе в России, препараты Пневмо-23, Превенар-7, Превенар-13 и Синфлорикс. Основным недостатком этих вакцин, несмотря на формирование специфической защиты и популяционного иммунитета [22], является ограниченное количество серотипов, против которых развивается иммунитет, высокая стоимость и технологические трудности производства [27]. Кроме того, в процессе вакцинации этими препаратами происходит замещение вакцинных штаммов на невакцинные [10], а оставшиеся в популяции после применения вакцин штаммы проявляют повышенную резистентность к антибиотикам [19]. У части носителей и заболевших этиологически значимыми возбудителями являются некапсулированные штаммы [17]. В связи с вышеизложенным, ведутся работы по конструированию серотипнезависимых вакцинных препаратов. К таким подходам относится, прежде всего, создание вакцин, состоящих из тех или иных белков пневмококка, вакцин из смеси белков пневмококка, использование белков этого микроба в качестве носителя для полисахаридов, и конъюгированных препаратов, ДНК-вакцины и цельноклеточные вакцины [11, 27]. Следует отметить, что акцент на конструирование белковых вакцин и ДНК-вакцин против пневмококка делали уже в 1999 г. [7]. Актуальными эти направления остаются и сегодня.

В 2010 — 2011 гг. нами опубликованы обзоры преимущественно зарубежной литературы, посвященные роли белков пневмококка в патогенезе инфекции, вызванной этим патогеном, и разработке экспериментальных вакцинных препаратов на их основе [1, 2]. В данном сообщении мы подробно останавливаемся на подходах к конструированию серотипнезависимых вакцин против пневмококка и на проблемах создания белковых вакцин, акцентируя внимание на разработках последних пяти лет. В обзоре подробно описаны кандидаты в экспериментальные вакцины на основе поверхностного белка А, пневмококкового поверхностного белка С, пневмолизоида, белков гистициновой триады, поверхностных белков, относящихся к JC47 антигенам, белков пневмококковых ворсинок, холинсвязывающего белка, липопротеина SPO845, белка Dna J, белка теплового шока, металлопротеиназы цинка В.

В 2012 г. опубликована статья, в которой авторы [15] суммировали и проанализировали материалы конференции по проблемам и трудностям создания белковых вакцин против пневмококка. Участники симпозиума выделяют три направления работы: создание вакцин из белков пневмококка; использование белков *S. pneumoniae* в качестве белковых носителей для полисахаридов; комбинация белков пневмококка с конъюгированными противопневмококковыми вакцинами.

В настоящее время описано около 20 белков пневмококка [15], функции установлены лишь у некоторых. Большинство исследователей считают, что комбинация белков будет обладать наиболее выраженным защитным действием в клинике. Неясно, какие белки и в каких комбинациях будут обеспечивать наилучшую защиту от пневмококковой инфекции у человека. По мнению авторов вышеуказанных работ, не существует какого-либо одного белкового антигена, введение которого защитит макроорганизм от летальной дозы микроба даже при доклинических испытаниях на животных. Остается вопрос, присутствуют ли выбранные для вакцины белки во всех штаммах микроба и защищают ли они от колонизации и разных форм пневмококковых заболеваний. Считается, что необходима репрезентативная коллекция штаммов для

отбора белковых антигенов и выбран подходящий адъювант, усиливающий как В-клеточный, так и Т-клеточный ответ. Известно, что для усиления Th17-ответа нужны соединения более эффективные, чем гидроокись алюминия. При создании белковой пневмококковой вакцины необходимо изучить перекрестную активность белков микроба и человека. Об этом свидетельствуют данные о том, что у перспективного в эксперименте белка PspA (поверхностного пневмококкового белка) были обнаружены общие антигены с человеческим сердечным миозином, что послужило причиной остановки для рекомендации его в качестве основы вакцины.

Кандидаты в вакцины должны быть нетоксичными, и важно, чтобы они имели вторичную и третичную структуру. Горизонтальная передача генов (обмен генов) может повлиять на защитные свойства белковых вакцин [15]. Ginsburg A.S et al. подробно останавливаются на экспериментальных вакцинах из поверхностного белка А, пневмолизинде (ана-форма пневмолизина), пневмококковом гистиридиновом белке Д, поверхностных белках, относящихся к JC47 антигенам, белкам пневмококковых ворсинок (Rtg B). В то же время, Tarahomjoo S. в своем обзоре [41] демонстрирует таблицу, в которой приводится ряд изученных в качестве вакцинных препаратов белков. Автор указывает, что белки, приготовленные из разных серотипов пневмококка, защищают от различных серотипов микроба. В работе проанализирован 21 белок патогена. Особая роль уделена пневмококковым поверхностным белкам А, С, пневмококковому адгезину А, пневмококковому протективному белку А, металлопротеиназе цинка В, белку теплового шока, белкам семейства гистиридиновой триады. Представлены данные, согласно которым одни белки защищают от отита, другие от пневмонии, третьи от колонизации. Автор наряду с другими исследователями придерживается мнения, что комбинация пневмококковых белков более эффективна, чем отдельные пневмококковые белки [41]. Однако нельзя не учитывать опубликованные работы, свидетельствующие о защитном действии отдельных белков у экспериментальных животных и людей [20, 24, 37].

В последние годы осуществляются испытания белковых вакцин, состоящих из комбинации следующих белков пневмококка: белка гистиридиновой триады Д, холинсвязывающего белка А, детоксицированного деривата пневмолизина [45]; пневмококкового поверхностного белка А и пневмококкового поверхностного белка С [43].

Изучается также иммуногенность тривалентной рекомбинантной белковой вакцины, в состав которой входят пневмококковый холинсвязывающий белок А, белок гистиридиновой триады Д и генетически детоксицированный пневмолизин [46].

На стадиях клинических испытаний находится ряд кандидатных препаратов на основе пневмококковых белков. Например, вакцина, состоящая из анатоксина пневмолизина и белка гистиридиновой триады Д, вызывала нарастание титров антител к белкам, входящим в нее, у детей в возрасте от 1 до 3 лет. При этом общие и местные реакции на введение препарата были сравнимы с таковыми при применении конъюгированной вакцины, в которой в качестве носителя используется белок D *Haemophilus influenzae*. Испытания вакцины проводили в Чехии [34]. Вакцина, приготовленная из анатоксина пневмолизина и белка Д гистиридиновой триады, прошла I и II фазы клинических испытаний у взрослых [23]. Препарат был иммуногенным по отношению к белкам, входящим в его состав, и не обладал реактогенностью и побочными действиями.

Наряду с конструированием вакцин из нескольких белков пневмококка проводятся испытания моновакцин. Примером могут служить препараты, включающие только пневмолизин (пневмолизойд), липопротеин SPO845 и ряд других белков [20, 33, 37].

Установлено, что не все белки *S. pneumoniae* обладают защитным действием в отношении пневмококковой инфекции. Так, в работе Lu J. et al. показано, что мутированный пневмолизин способствует выработке провоспалительных цитокинов на уровне немутированного пневмолизина, в то время как антитела к мутанту не обеспечивают протективный эффект. Поэтому пневмолизин (его мутант) в составе вакцины, по-видимому, скорее будет адьювантом, чем активным началом [25]. Pore C. et al. обсуждают, что токсичный пневмолизин обладает меньшей иммуногенной активностью по сравнению с пневмолизойдом [33]. В этой же работе делается предположение, согласно которому конъюгация поверхностного пневмококкового белка А с нетоксичной формой пневмолизина облегчит доставку поверхностного белка А к поверхности антигенпредставляющих клеток.

Пневмолизин, который является агонистом TLR4, может быть как активным действующим компонентом вакцины, так и адьювантом для других белков микроба. Работами Liu Y. et al. продемонстрировано, что при применении слитого с пневмолизойдом белка пневмококка Dna J зарегистрировано повышение уровня IgG, IgA против Dna J в сыворотке и слюне мышей, соответственно, а также продукции ИЛ-17 по сравнению с опытами, в которых изучаемый белок применяли без пневмолизина [24]. В литературе обсуждается вопрос об участии пневмолизина в формировании пневмококковых биопленок в организме хозяина. Штаммы патогена, дефицитные по этому параметру, не формируют биопленок. В связи с этим, считается перспективным включение пневмолизина в состав вакцины против *S. pneumoniae* [39]. Другими исследователями установлено защитное действие пневмолизойда. Так, детоксицированный пневмолизин, применяемый как моновакцина, оказался нереактогенным и иммуногенным при испытании на 100 пациентах [20]. Повторная вакцинация значительно увеличивала уровень противопневмолизинных антител. Функциональная антительная активность продемонстрирована при работе с сыворотками, полученными от вакцинированных людей. Иными словами, одними исследователями продемонстрирован защитный эффект пневмолизойда, а другие его не наблюдали.

Группой Saxena S. et al. в 2015 г. был предложен липопротеин SPO845 из штамма TIGR4 в качестве кандидата в вакцину против пневмококковой инфекции. Доказано перекрестное протективное действие этого белка в отношении гетерологичных штаммов микроба [37].

Для создания полноценного иммунного ответа на белковые пневмококковые вакцины идет поиск разных адьювантов. Применяются агонисты TOLL-подобных рецепторов (прежде всего, TLR7, TLR9) [44], цельноклеточная убитая коклюшная вакцина или токсин этого микроба [34], живые аттенуированные микробы [47]. Все предлагаемые адьюванты в опытах на животных сравнивают с классическим адьювантом — гидроксидом алюминия. В этих экспериментах показано преимущество новых предлагаемых подходов по сравнению с гидроксидом алюминия [36, 44, 47].

Еще одним направлением является добавление одного или нескольких пневмококковых белков к конъюгированным вакцинам. Доклинические испытания таких препаратов также ведутся [15].

Использование белков пневмококка в качестве носителя для полисахари-

дов позволит получить вакцину, способную создавать иммунитет не только в отношении полисахаридов использованных серотипов. Pichichero M.E. приводит данные об исследовании разных доз, схем введения на формирование иммунного ответа на повторное введение препаратов, в которых в качестве носителя используется один пневмококковый белок в сочетании с одним полисахаридом, один белок и несколько полисахаридов, несколько белковых носителей с несколькими полисахаридами [31]. В 2014 г. были также опубликованы данные об успешном доклиническом испытании вакцины, в которой в качестве носителя был применен пневмококковый поверхностный белок А, конъюгированный с капсульным полисахаридом серотипа 6В. Авторами работы зарегистрирован подъем антител против белкового носителя [6].

Ведущие исследователи в области разработки пневмококковых вакцин считают необходимым при создании вакцины определить функции белков, из которых будет состоять препарат. Интересные результаты в связи с этим опубликованы Schachern P.A. et al. [38]. Экспериментаторы изучали жизнеспособность и вирулентность трех штаммов пневмококка — дикого, дефицитного по поверхностному белку С, дефицитному по поверхностному белку А и двойного мутанта. Разницы между мутантом по поверхностному белку А и двойным мутантом обнаружено не было. Авторы сделали вывод, что нет необходимости исключать поверхностный белок С из поликомпонентной вакцины, содержащей поверхностный белок А. Белки гистидинового триады — PhtA, PhtB, PhtD, PhtE играют существенную роль в патогенезе пневмококка, осуществляют прикрепление микроба к клеткам хозяина. В связи с этим, данные белки весьма перспективны для разработки пневмококковой вакцины [32].

В обзоре [3] подробно разобраны факторы патогенности пневмококка (включая разнообразные белки патогена) и проанализирована их протективная активность. Авторы работы дискутируют по поводу использования белков микроба в качестве кандидатов в пневмококковые вакцины.

Как известно, поверхностный белок А пневмококка включает в себя 3 семейства и 6 клайдов. Анализируя накопленные данные о зависимости строения белков пневмококка и их отношение к 1 или 2 семейству, можно сделать вывод о том, что деление рода *S. pneumoniae* на семейства определяется, прежде всего, различием белков, а не разным строением капсулы. Хотя некоторые типы капсулы чаще встречаются у организмов 1 или у патогенов 2 семейства [18]. Важное наблюдение было сделано при работе с пневмококковыми поверхностными белками А, происходящими из разных семейств пневмококка и относящимися к разным клайдам. Белки из клайдов 3 и 2, но не 2 и 4 или 2 и 5 обладали перекрестной защитой по отношению к микробам 1 — 4 клайдов. Следует отметить, что этот белок не защищал от патогена клайда 5 [30]. В 2013 г. была опубликована работа, в которой рекомендуется использовать в качестве кандидатов в вакцины поверхностные белки А как 1, так и 2 семейств [32].

Новым направлением в области создания белковых пневмококковых вакцин является использование белков теплового шока этого микроба. Препарат показал выраженную защиту от колонизации носоглотки серотипами 6В, 14 и от колонизации легких серотипом 19F на мышинной модели. Сыворотки от иммунизированных мышей вызывали формирование пассивной защиты, причем использование сыворотки от животных, иммунизированных несколькими белками, оказалось более эффективным, чем моносыворотки [9].

Наряду с определением протективной активности белков пневмококка

ведется изучение молекулярных и клеточных механизмов их действия на иммунную систему. Примером может послужить работа Cao J. et al., в которой описывается воздействие рекомбинантного холинсвязывающего белка пневмококка на TLR4 на поверхности дендритных клеток, увеличение экспрессии на них поверхностных молекул и секреция этими клетками цитокинов и хемокинов по MAPKs и NFκB-зависимым путям [8]. Хорошо изучено воздействие белков клеточной стенки микроба на TLR2 [28]. Также обсуждается вопрос о том, является ли активность пневмолизина TLR4-зависимым или TLR4-независимым процессом.

К серотипнезависимым вакцинам можно отнести цельноклеточные убитые вакцины. Примером может служить убитая 70% этанолом вакцина, состоящая из микробных клеток капсулодефицитного штамма D39. Адьювантом этой вакцины служил холерный токсин. Препарат вводили интраназально мышам линии BALB/c. Продемонстрирована защита от колонизации штаммами серотипа 19F, а также от летальной инфекции, вызванной микробами серотипов 3 и 6B. Сыворотки от этих животных пассивно защищали мышей от инвазивных заболеваний, ассоциированных с заражением штаммом D39 [50].

В обзоре Feldman C. et al. внимание также сфокусировано на белковых и цельноклеточных вакцинах [12].

Goncalves V.M. et al. сконструирована пневмококковая цельноклеточная вакцина, защищающая мышей от внутрибрюшинного заражения [16]. Препарат оказался эффективным и стабильным на протяжении 12 — 18 месяцев после приготовления.

Перспективным направлением вакцинологии является разработка цельноклеточных аттенуированных вакцин. К достоинствам этих препаратов относится их низкая стоимость приготовления. Аттенуированные цельноклеточные вакцины не требуют адьювантов. Однако не все антигены, содержащиеся в убитых бактериях, участвуют в протекции против пневмококка. Некоторые из этих антигенов могут мешать формированию защиты. Иммуногенные поверхностные антигены варьируют от серии к серии цельноклеточной вакцины [41].

В последние годы ведутся интересные разработки по созданию живых аттенуированных вакцин против пневмококка. Эти препараты также являются серотипнезависимыми. Wu K. et al. продемонстрировали, что приготовленная из штамма SPY1 вакцина создает защиту мышей и людей от колонизации микробами серотипами 19F и штаммом TIGR4 и от инвазивной инфекции, вызванной штаммом D39 и клиническими штаммами серотипов 6B и 3. Протективный эффект был выражен сильнее, чем у коммерческих вакцин [49]. Штамм, применяемый для конструирования этой вакцины, имел дефекты по трем факторам вирулентности: капсуле, тейхоевым кислотам и пневмолизину. Rosch J.W. считает перспективным для защиты от мукозальной и системной инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, применять живые аттенуированные вакцины [35].

Появились статьи, в которых обсуждается конструирование бивалентной рекомбинантной вакцины против гриппа и пневмококка. PB2-KO штамм вируса гриппа, экспрессирующий поверхностный пневмококковый белок А, вызывал продукцию высоких титров специфических противогриппозных антител и антител против белка А в сыворотке и дыхательных путях мышей и защищал животных от летальной инфекции, индуцированной двумя этими патогенами. Мыши были полностью защищены от первичной и вторичной пневмококковой пневмонии [21, 42].

Опубликована работа, в которой обсуждается вопрос о том, может ли колонизация пневмококком слизистых оболочек оказывать защитное действие и предупреждать легочную инфекцию [48]. Авторы установили потерю такой защиты у мышей, дефицитных по нейтрофилам и В-лимфоцитам, и показали, что колонизация не защищала от пневмококковой инфекции мышей, дефицитных по CD4+ и ИЛ-17. Полученные данные наводят на мысль о том, что вакцинация против пневмококка должна приводить к формированию как гуморального, так и клеточного иммунитета.

Следует отметить, что во всех работах по созданию белковых вакцин против пневмококка используют рекомбинантные белки. В статье Vadesilho C.F. et al. приводятся данные об отсутствии протективной активности у линейных эпитопов и наличии таковой при использовании конформационных структур поверхностного пневмококкового белка А и поверхностного пневмококкового белка С [43]. В то же время, иммунизация мышей фрагментом из 100 аминокислот, расположенным в N-концевой области поверхностного белка А пневмококка, вызывала защиту от заражения *S.pneumoniae*. Выработка антител против конформационных эпитопов, присутствующих в N-терминальной области поверхностного белка А пневмококка, может оказаться важной стратегией для защиты от широкого круга серотипов возбудителя [43].

Интересные данные получены при изучении пневмококковых белков методами BLASTn и BLASTp, т.е. при определении последовательности нуклеотидов и аминокислот. Было проанализировано 22 белка пневмококка. Кандидатами в вакцины выбрали *ravB* и пуллулазу [40].

Преимуществом ДНК-вакцин против пневмококка является то, что они создают выраженный гуморальный и клеточный иммунитет, как и другие ДНК-вакцины. Однако был выявлен и основной недостаток этих препаратов. Они формируют защиту только против гомологичного клэйда [26] или нескольких клэйдов. Защитный эффект был сравним с таковым рекомбинантного белка [12]. Для ДНК-вакцин требуется специальная система доставки. Хитозан — одна из таких систем [41].

Возможно, ограниченная перекрестная активность ДНК-вакцин объясняется отсутствием альтернативного сплайсинга и эпигенетических изменений при транскрипции РНК с ДНК-вакцины. В сравнительных экспериментах на животных было установлено, что рекомбинантные белки пневмококка вызывают более выраженную защиту и индуцируют более высокий уровень гомологичных антител, чем ДНК-вакцины на основе нуклеиновых кислот того же белка. ДНК-вакцина на основе пневмолизоида в опытах Ferreira D.M et al. вообще оказалась не эффективной [13, 14]. Перспективным является использование комбинированных ДНК/белковых вакцинных препаратов [29].

В НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова ведется изучение перекрестной внутривидовой протективной и серологической активности белоксодержащих антигенов пневмококка. В 2013 году опубликована статья, в которой представлены данные по защите от заражения серотипами 3 и 6В пневмококка мышей, иммунизированных белоксодержащими антигенами, полученными из серотипов 6В и 10А методом водной экстракции. Препараты из штаммов серотипов 6А, 6В, 14, 19А, 19F, 23F в реакции с антимикробными сыворотками характеризовались перекрестной серологической активностью (титр IgG 1200 — 12800) [4]. Ранее Ниселевичем В.Ф. и др. установлено, что иммунизация мышей препаратами из серотипов пневмококка 3R, 6R, R-36A, 3, полученными методом экстракции цетавлоном (серотип 3) или методом дезинтеграции ультразвуком (бескапсульные штаммы), защищают животных

от заражения штаммами серотипов 3, 9N, 23F [5]. Однако ни один из препаратов не приводил к 100% защите от летальной инфекции. Максимальный протективный эффект составил 62%.

В заключении следует отметить, что создание серотипнезависимых вакцин включает в себя четыре основных направления — конструирование белковых вакцин на основе рекомбинантных белков пневмококка, цельноклеточные убитые и аттенуированные вакцины, ДНК-вакцины и использование белков *S. pneumoniae* в качестве носителя для полисахаридных и конъюгированных вакцинных препаратов. Наиболее широко изученными являются белковые вакцины. ДНК-вакцины изучали в первой половине 2000-х годов, и сейчас этому вопросу уделяется меньше внимания. На наш взгляд, для конструирования эффективной противопневмококковой вакцины необходимо дальнейшее изучение патогенетических механизмов действия пневмококковых белков на организм хозяина и молекулярно-генетических процессов их влияния на иммунную систему.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев Д.С., Семенова И.Б. Пневмококковый поверхностный белок А и новые подходы к разработке пневмококковых вакцин. Журн. микробиол. 2011, 6: 107-113.
2. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Курбатова Е.А. Белки *Streptococcus pneumoniae*: перспективы для создания вакцины против пневмококковой инфекции. Журн. микробиол. 2010, 6: 98-103.
3. Костокова Н.Н., Бехало В.А. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства. Журн. микробиол. 2014, 3:67-77.
4. Курбатова Е.А., Воробьев Д.С., Егорова Н.Б., Батуро А.П., Романенко Э.Е., Маркова М.Е., Елкина С.И., Волох Ю.В., Цветков Ю.Е., Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Нифантьев Н.Э., Михайлова Н.А. Штаммовые различия внутривидовой иммуногенной активности антигенных компонентов *Streptococcus pneumoniae*. Журн. микробиол. 2013, 5: 60-69.
5. Нисилевич В.Ф., Пугачева Н.Л., Падюков Л.Н., Грубер И.М., Решилов Л.Н. Сравнительный анализ антигенных препаратов из некапсульных штаммов пневмококка. Журн. микробиол. 1987, 1: 8-12.
6. Barazzone G.C, Pinto V, Donnarumma D. et al. Identification of glycosylated regions in pneumococcal PspA conjugated to serotype 6B capsular polysaccharide. Glycoconj. J. 2014, 31 (3): 259-269.
7. Butler J.C, Shapiro E.D., Carlone G.M. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. Am. J. Med. 1999, 107 (1A): 69S-76S.
8. Cao J., Gong Y., Dong S. et al. Pneumococcal ClpP modulates the maturation and activation of human dendritic cells: implications for pneumococcal infections. J. Leukoc. Biol. 2013, 93 (5): 737-749.
9. Cao J., Zhang X., Gong Y. et al. Protection against pneumococcal infection elicited by immunization with multiple pneumococcal heat shock proteins. Vaccine. 2013, 31 (35): 3564-3571.
10. Croucher N.J., Chewapreecha C., Hanage W.P. et al. Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. Genome. Biol. Evol. 2014, 6 (7): 1589-1602.
11. Darrieux M., Goulart C., Briles D., Leite L.C. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. Crit. Rev. Microbiol. 2015, 41 (2): 190-200.
12. Feldman C., Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. J. Infect. 2014, 69 (4): 309-325.
13. Ferreira D.M., Arêas A.P., Darrieux M. et al. DNA vaccines based on genetically detoxified derivatives of pneumolysin fail to protect mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 2006, 46 (2): 291-297.
14. Ferreira D.M., Miyaji E.N., Oliveira M.L. et al. DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. J. Med. Microbiol. 2006, 55 (4): 375-378.



15. Ginsburg A.S., Nahm M.H., Khambaty F.M., Alderson M.R. Issues and challenges in the development of pneumococcal protein vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2012, 11 (3): 279-285.
16. Gonçalves V.M., Dias W.O., Campos I.B. et al. Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability. *Vaccine*. 2014, 32 (9): 1113-1120.
17. Hilty M., Wüthrich D., Salter S.J. et al. Global phylogenomic analysis of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* reveals a deep-branching classic lineage that is distinct from multiple sporadic lineages. *Genome Biol. Evol.* 2014, 6 (12): 3281-3294.
18. Hotomi M., Togawa A., Kono M. et al. PspA family distribution, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolated from upper respiratory tract infections in Japan. *PLoS One*. 2013, 8 (3): e58124.
19. Janoir C., Cohen R., Levy C. et al. Clonal expansion of the macrolide resistant ST386 within pneumococcal serotype 6C in France. *PLoS One*. 2014, 9 (3): e90935.
20. Kamtchoua T., Bologna M., Hopfer R. et al. Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. *Vaccine*. 2013, 31 (2): 327-333.
21. Katsura H., Piao Z., Iwatsuki-Horimoto K. et al. A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza virus protects against *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus infection. *J. Virol.* 2014, 88 (22): 13410-13417.
22. Kim T.H., Johnstone J., Loeb M. Vaccine herd effect. *Scand. J. Infect. Dis.* 2011, 43 (9): 683-689.
23. Leroux-Roels G., Maes C., De Boever F. et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a novel pneumococcal protein-based vaccine in adults: a phase I/II randomized clinical study. *Vaccine*. 2014, 32 (50): 6838-6846.
24. Liu Y., Wang H., Zhang S. et al. Mucosal immunization with recombinant fusion protein DnaJ- $\Delta$ A146Ply enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice via interleukin 17A. *Infect. Immun.* 2014, 82 (4): 1666-1675.
25. Lu J., Sun T., Hou H. et al. Detoxified pneumolysin derivative Plym2 directly protects against pneumococcal infection via induction of inflammatory cytokines. *Immunol. Invest.* 2014, 43 (7): 717-726.
26. Miyaji E.N., Ferreira D.M., Lopes A.P. et al. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. *Infect. Immun.* 2002, 70 (9): 5086-5090.
27. Miyaji E.N., Oliveira M.L., Carvalho E., Ho P.L. Serotype-independent pneumococcal vaccines. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2013, 70 (18): 3303-3326.
28. Moffitt K., Howard A., Martin S. et al. TH17-mediated protection against pneumococcal carriage by a whole cell vaccine is dependent on Toll-like receptor 2 and surface lipoproteins. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015, 22 (8): 909-916.
29. Moore Q.C., Bosarge J.R., Quin L.R., McDaniel L.S. Enhanced protective immunity against pneumococcal infection with PspA DNA and protein. *Vaccine*. 2006, 24 (29-30): 5755-5761.
30. Piao Z., Akeda Y., Takeuchi D. et al. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014, 32 (43): 5607-5613.
31. Pichichero M.E. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013, 9 (12): 2505-2523.
32. Plumtre C. D., Ogunniyi A. D., Paton J. C. Surface association of Pht proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2013, 81 (10): 3644-3651.
33. Pope C., Oliver E.H., Ma J. et al. Genetic conjugation of components in two pneumococcal fusion protein vaccines enhances paediatric mucosal immune responses. *Vaccine*. 2015, 30; 33 (14): 1711-1718.
34. Prymula R., Pazdiora P., Traskine M. et al. Safety and immunogenicity of an investigational vaccine containing two common pneumococcal proteins in toddlers: a phase II randomized clinical trial. *Vaccine*. 2014, 23; 32 (25): 3025-3034.
35. Rosch J.W. Promises and pitfalls of live attenuated pneumococcal vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014, 10 (10): 3000-3003.
36. Salcedo-Rivillas C., Debie A.S., Miyaji E.N. et al. Pertussis toxin improves immune re-

- sponses to a combined pneumococcal antigen and leads to enhanced protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014, 21 (7): 972-981.
37. Saxena S., Khan N., Dehinwal R. et al. Conserved surface accessible nucleoside ABC transporter component SP0845 is essential for pneumococcal virulence and confers protection in vivo. *PLoS One.* 2015, 17; 10 (2): e0118154.
  38. Schachern P.A., Tsuprun V., Ferrieri P. et al. Pneumococcal PspA and PspC proteins: potential vaccine candidates for experimental otitis media. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2014, 78 (9): 1517-1521.
  39. Shak J.R., Ludewick H.P., Howery K.E. et al. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *MBio.* 2013, 4 (5): e00655-13.
  40. Talukdar S., Zutshi S., Prashanth K.S. et al. Identification of potential vaccine candidates against *Streptococcus pneumoniae* by reverse vaccinology approach. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 172 (6): 3026-3041.
  41. Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 24 (4): 215-227.
  42. Uraki R., Piao Z., Akeda Y. et al. A bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from secondary pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2015, 212 (12): 1939-1948.
  43. Vadesilho C.F., Ferreira D.M., Gordon S.B. et al. Mapping of epitopes recognized by antibodies induced by immunization of mice with PspA and PspC. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014, 21 (7): 940-948.
  44. Vecchi S., Bufali S., Uno T. et al. Conjugation of a TLR7 agonist and antigen enhances protection in the *S. pneumoniae* murine infection model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014, 87 (2): 310-317.
  45. Verhoeven D., Perry S., Pichichero M.E. Contributions to protection from *Streptococcus pneumoniae* infection using the monovalent recombinant protein vaccine candidates PcpA, PhtD, and PlyD1 in an infant murine model during challenge. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014, 21 (8): 1037-1045.
  46. Verhoeven D., Xu Q., Pichichero M.E. Vaccination with a *Streptococcus pneumoniae* trivalent recombinant PcpA, PhtD and PlyD1 protein vaccine candidate protects against lethal pneumonia in an infant murine model. *Vaccine.* 2014, 30; 32 (26): 3205-3210.
  47. Vintiñi E.O., Medina M. Immune response in nasopharynx, lung, and blood elicited by experimental nasal pneumococcal vaccines containing live or heat-killed lactobacilli as mucosal adjuvants. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014, 92 (2): 124-131.
  48. Wilson R., Cohen J.M., Jose R.J. et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal. Immunol.* 2015, 8 (3): 627-639.
  49. Wu K., Yao R., Wang H. et al. Mucosal and systemic immunization with a novel attenuated pneumococcal vaccine candidate confer serotype independent protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Vaccine.* 2014, 16; 32 (33): 4179-4188.
  50. Xu X., Meng J., Wang Y. et al. Serotype-independent protection against pneumococcal infections elicited by intranasal immunization with ethanol-killed pneumococcal strain, SPY1. *J. Microbiol.* 2014, 52 (4): 315-323.

*Поступила 20.01.16*

Контактная информация: Семенова Ирина Борисовна, д.м.н.,  
105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-57-74