

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВАКЦИН И СЫВОРОТОК  
ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»**

*На правах рукописи*

**ЗАЙЦЕВ Антон Евгеньевич**

**ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ  
КОНЬЮГИРОВАННЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ – СИНТЕТИЧЕСКИХ  
АНАЛОГОВ ФРАГМЕНТОВ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА  
*Streptococcus pneumoniae* серотипа 3**

**ДИ С С Е Р Т А Ц И Я**

**14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология**

**на соискание ученой степени кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель**

доктор медицинских наук, профессор,  
Е.А.Курбатова

**Москва- 2022**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	14
<b>ГЛАВА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММУНОГЕННОСТИ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА <i>Streptococcus pneumoniae</i> СЕРОТИПА 3 В СОСТАВЕ ПНЕВМОКОККОВЫХ ВАКЦИН</b>	14
<b>ГЛАВА 2. КОНЬЮГАТЫ БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ С ОЛИГОСАХАРИДАМИ – СИНТЕТИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА <i>Streptococcus pneumoniae</i> СЕРОТИПА 3, И ИХ ИММУНОГЕННОСТЬ</b>	31
<b>ЧАСТЬ II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	47
<b>ГЛАВА I. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	47
1.1. Препараты	47
1.2. Лабораторные животные	49
1.3. Получение иммунных сывороток	49
1.4. Иммунизация мышей	50
1.5. Определение титров антител в сыворотках крови иммунизированных мышей в ИФА	50
1.6. Антигенсвязывающая способность антител, индуцированных к гликоньюгатам	52
1.7. Агглютинация на стекле	53
1.8. Антитело-зависимый фагоцитоз (опсонофагоцитоз)	53
1.9. Протективная активность гликоконьюгатов	54
1.10. Контроль содержания бактериального эндотоксина в гликоконьюгатах с помощью ЛАЛ-теста	55
1.11. Индукция цитокинов биотинилированными олигосахаридами <i>in vitro</i>	55
1.12. Продукция цитокинов у мышей <i>ex vivo</i>	56
1.13. Экспрессия поверхностных молекул на мононуклеарных клетках селезенки мышей	56
1.14. Определение антител к двуспиральной ДНК	57
1.15. Статистический анализ	57

<b>ГЛАВА 2. АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОСАХАРИДОВ, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ФРАГМЕНТАМ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА <i>S. pneumoniae</i> серотипа 3</b>	59
2.1. Специфичность распознавания антителами к КП <i>S. pneumoniae</i> серотипа 3 биотинилированных ди-, три- и тетрасахаридов	59
2.2. Способность лигандов олигосахаридов взаимодействовать с антителами к капсульному полисахариду <i>S. pneumoniae</i> серотипа 3	61
2.3. Способность олигосахаридспецифических антител взаимодействовать с капсульным полисахаридом	63
<b>ГЛАВА 3. ИЗОТИПЫ ОПСОНИЗИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ, УГЛЕВОДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ К КОНЬЮГИРОВАННЫМ ОЛИГОСАХАРИДАМ, И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕОГЛИКОКОНЬЮГАТОВ</b>	66
3.1. Выбор дозы и схемы иммунизации	66
3.2. Изотипы антител углеводной специфичности, индуцированные к конъюгированным олигосахаридам	69
3.3. Агглютинирующая способность сывороток к гликоконъюгатам	73
3.4. Антитело-зависимый фагоцитоз (опсонофагоцитоз)	75
3.5. Протективная активность гликоконъюгатов	76
<b>ГЛАВА 4. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ И ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ НА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ НЕОГЛИКОКОНЬЮГАТАМИ</b>	79
4.1. Содержание эндотоксина в гликоконъюгатах	79
4.2. Цитокины <i>in vitro</i>	79
4.3. Цитокины <i>ex vivo</i>	82
4.4. Экспрессия поверхностных молекул на мононуклеарных лейкоцитах селезенки мышей	89
4.5. Антитела к двуспиральной ДНК	98
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	99
<b>ВЫВОДЫ</b>	108
<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	110

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	антитело
БСА	бычий сывороточный альбумин
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
КОЕ	колониеобразующая единица
КП	капсульный полисахарид
ЛАЛ	лизат амебоцитов <i>Limulus</i> ( <i>Limulus ameboocyte lysate</i> )
ЛПС	липополисахарид
М.к.	микробная клетка
МкАт	моноклональное антитело
ОП	оптическая плотность
РПГА	реакция пассивной гемагглютинации
ТМБ	тетраметилбензидина раствор
ФСБ	фосфатно-солевой буферный раствор
ФТС	фетальная телячья сыворотка
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
АL	алюминия гидроксид
CD	cell differentiation antigens или cluster definition - антиген кластеров дифференцировки клеток
CRM <sub>197</sub>	immunologically cross-reacting mutant protein of diphtheria toxin или cross-reactive material – нетоксичная форма рекомбинантного дифтерийного анатоксина (белок-носитель)
FAS	Fas(CD95/APO-1) - гликозилированный поверхностный белок мембраны клеток, известен как апоптозный антиген
FITC	fluorescein isothiocyanate - флуоресцеин изотиоцианат (зеленый флюорохром)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
I-A <sup>k</sup>	МНС класса II мыши
IC <sub>50</sub>	inhibition concentration – 50 %-ная ингибирующая концентрация
IFN	interferon – интерферон
Ig	immunoglobulin - иммуноглобулин
IL	interleukine – интерлейкин
KLH	keyhole limpet hemocyanin - гемоцианин лимфы улитки
LD50	доза, вызывающая гибель 50% животных
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
МНС	major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости
NK	natural killer - натуральные киллеры

NKT	Т-киллеры
PE	phycoerythrin – фикоэритрин (красный флюорохром)
PRR	pathogen-associated pattern recognition receptor – паттерн-распознающий рецептор патогена
Th	T-helper – Т-хелпер
TLR	Toll-like receptor – Толл-подобный рецептор
TNF	tumor necrosis factor – фактор некроза опухолей
TRAIL	цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз
Treg	Т-регуляторный лимфоцит
TT	tetanus toxoid - столбнячный анатоксин
vs	<i>versus</i> - против

## ВВЕДЕНИЕ

Включение в национальные программы иммунизации многих стран мира, в том числе России, пневмококковых вакцин, привело к снижению количества заболеваний, вызываемых серотипами *Streptococcus pneumoniae*, капсульные полисахариды (КП) которых входят в их состав.

*Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) – условно патогенные грамположительные бактерии. Большая часть штаммов пневмококка окружена капсулой, содержащей полисахариды. Молекула капсульного полисахарида (КП) представляет собой длинные линейные или разветвлённые цепи, состоящие из олигосахаридных повторяющихся звеньев [97]. В настоящее время описано более 90 серологических типов *S. pneumoniae*, различающихся по химической структуре и антигенным свойствам капсульного полисахарида (КП). Примерно 20 серотипов пневмококка могут быть причиной тяжелых заболеваний с различной локализацией патологического процесса у детей и взрослых. КП клинически значимых серотипов *S. pneumoniae* входят в состав современных полисахаридных и конъюгированных пневмококковых вакцин.

Заболевания, вызываемые *S. pneumoniae* серотипа 3 ассоциированы с высоким риском летального исхода у взрослых и детей [68, 75, 76, 87, 90, 193]. Показано, что штаммы серотипа 3, доминирующие в популяции взрослых [69, 76, 90, 132, 136, 169], являются причиной внебольничной пневмонии [11, 41, 100], тяжелых гнойно-некротических процессов в легочной ткани [27, 36] и заболеваний внелегочной локализации [45, 61, 139].

Данные о профилактической и иммунологической эффективности КП *S. pneumoniae* серотипа 3 – противоречивы и дискуссии по этому вопросу продолжаются. В одних исследованиях показана эффективность КП серотипа 3 [54, 111, 117, 183], в других - отмечают его недостаточную иммуногенность [17, 138, 154, 165, 172, 174]. Это объясняется тем, что в отличие от других серотипов пневмококка, полисахарид капсулы *S. pneumoniae* серотипа 3 не

образует ковалентной связи с пептидогликаном клеточной стенки и может высвобождаться в окружающую среду, связывая антитела, индуцированные введением вакцин [42]. Низкая иммуногенность КП *S. pneumoniae* серотипа 3 может быть обусловлена индукцией антител к различным эпитопам КП, в том числе неиммуногенным [182]; смещением рамки считывания при экспрессии генов, ответственных за продукцию КП [40, 118, 198].

Протективные эпитопы КП *S. pneumoniae* могут быть представлены синтетическими олигосахаридами [95] с точно охарактеризованной химической структурой [194]. Конъюгация олигосахаридов с белком-носителем индуцирует Т-зависимый иммунный ответ, приводящий к образованию IgG-антител и защите от заражения пневмококком [42, 177]. Некоторые конъюгаты с олигосахаридами обладают даже более высокой иммуногенностью, чем конъюгированные КП [95].

Показано, что конъюгаты синтетических ди-, три- и тетрасахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 характеризовались примерно одинаковой протективной активностью [26]. Конъюгаты тетра-, пента-, гекса-, гепта- и октасахарида, соответствующие фрагментам цепи КП *S. pneumoniae* серотипа 3, вызвали образование олигосахаридспецифических IgG-антител у мышей и обладали протективной активностью [59, 98, 140, 197].

Молекулярно-клеточный механизм действия конъюгированных пневмококковых вакцин остается недостаточно изученным. Более подробно исследованы иммунологические показатели при экспериментальной пневмококковой инфекции у мышей, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3. Установлено, что ключевыми эффекторами иммунитета при пневмококковой инфекции, вызванной серотипом 3, являются:  $\gamma\delta$  Т-клетки, НКТ-клетки при продукции Th1 и/или Th17-цитокинов [92, 93].

До настоящего времени не проводили углубленного сравнительного исследования иммунологической активности конъюгированных ди-, три- и тетрасахаридов, соответствующих фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Выбор наиболее иммуногенного олигосахарида открывает новые

возможности для повышения иммунологической эффективности этого компонента в составе пневмококковых вакцин.

### **Степень разработанности темы**

В опытах активной защиты мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 конъюгаты синтетических ди-, три- и тетрасахаридов характеризовались примерно одинаковой протективной активностью [26]. Последующие исследования показали, что конъюгаты тетра-, пента-, гекса-, гепта- и октасахарида вызвали образование олигосахаридспецифических IgG-антител у мышей и обладали протективной активностью [59, 98, 140, 197]. Исследована возможность расширения спектра действия конъюгированных пневмококковых вакцин путем включения в их состав конъюгатов CRM<sub>197</sub> с синтетическими олигосахаридами, соответствующими фрагментам КП *S. pneumoniae*, серотипы которых не входят в состав вакцин; разработана формула пентавалентной полусинтетической вакцины [98]. Данных по оценке молекулярно-клеточного механизма действия неогликоконъюгатов на иммунную систему в доступной литературе не найдено.

**Цель.** Исследование иммунологической активности конъюгатов синтетических ди-, три- и тетрасахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

### **Задачи исследования:**

1. Оценить антигенную активность ди-, три- и тетрасахаридов в сравнении с капсульным полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 3.
2. Определить изотип и уровень антител углеводной специфичности в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА, адсорбированными на геле алюминия гидроксида.

3. Оценить опсонизирующую способность олигосахаридспецифических антител.
4. Исследовать протективную активность гликоконъюгатов в опытах активной защиты мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3.
5. Определить ключевые цитокины и маркеры активации клеточно-опосредованного звена иммунитета у мышей, иммунизированных гликоконъюгатами.

### Научная новизна

Впервые показано, что синтезированные ди-, три- и тетрасахариды, имеют общие иммунологически активные антигенные структуры с капсульным полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 3. Установлено, что конъюгат тетрасахарида, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, обладает наибольшей способностью к активации эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета.

С помощью модифицированного метода ИФА с использованием биотинилированных олигосахаридов впервые показано, что тетрасахарид в высоком титре выявляет антитела, специфичные к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3, по сравнению с ди- и трисахаридом.

Конъюгат тетрасахарида с БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, индуцирует образование олигосахаридспецифических IgM-, IgG1-, IgG2a- и IgG2b-антител у мышей, при меньшем разнообразии изотипов антител в ответ на введение конъюгатов ди- и трисахаридов.

На модели пневмококковой инфекции у мышей, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3, впервые показано, что протективная активность адсорбированных на геле алюминия гидроксида конъюгатов три- и тетрасахарида, выше, чем адсорбированного конъюгата дисахаридов.

Впервые показан высокий уровень продукции Th1/Th2/Th17 цитокинов спленоцитами мышей, индуцированной биотинилированными

олигосахаридами, при более высокой стимулирующей активности тетрасахарида.

На примере конъюгата дисахарид-БСА раскрыты дополнительные свойства конъюгированных олигосахаридов, характеризующиеся способностью повышать уровень IL-17A, (TCR<sup>+</sup>)  $\gamma\delta$  Т-клеток, CD5<sup>+</sup> В1-клеток, а также активированных клеток, экспрессирующих молекулы МНС класса II .

### **Теоретическая значимость**

Полученные данные о действии конъюгированных олигосахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, вносят вклад в понимание иммунологических механизмов поствакцинальной защиты от пневмококковой инфекции на системном, клеточном и молекулярном уровнях, расширяя знания в области вакцинологии и фундаментальной иммунологии. Обосновано проведение дальнейших исследований, направленных на поиск агонистов  $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток.

### **Практическая значимость**

Высокая иммуногенность конъюгата синтетического тетрасахарида с БСА указывает на перспективность его использования в составе конъюгатов с другими белками – носителями, разрешенными к применению в клинической практике, а также как компонента при разработке поливалентной полусинтетической пневмококковой вакцины третьего поколения. Использование биотинилированного тетрасахарида при конструировании ИФА тест-систем позволит с высокой степенью точности идентифицировать КП *S. pneumoniae* серотипа 3 или определять уровень антител к КП.

## Методология и методы исследования

Ди-, три- и тетрасахариды и их конъюгаты синтезированы в ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Для индукции Т-зависимого иммунного ответа у мышей исследуемые олигосахариды конъюгировали с БСА. Для определения уровня антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) использовали конъюгаты олигосахаридов с биотином, иммобилизованные на пластике планшетов, покрытых стрептавидином. Выбор оптимальной иммунизирующей дозы и схемы иммунизации проводили на мышах, иммунизированных гликоконъюгатами без адъюванта и с адъювантом (алюминия гидроксид). В качестве препарата сравнения использовали 13-валентную конъюгированную пневмококковую вакцину (Превенар 13), содержащую в своем составе КП *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированный с CRM<sub>197</sub> и алюминия фосфат в качестве адъюванта. Опсонизирующую активность антител определяли по способности нейтрофилов и моноцитов крови интактных мышей захватывать инактивированные клетки *S. pneumoniae* серотипа 3 в присутствии иммунной и нативной сывороток с детекцией результатов с помощью проточной цитофлуориметрии. Протективную активность гликоконъюгатов исследовали в опытах активной защиты мышей от заражения штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3. Продукцию цитокинов определяли *in vitro* в монокультуре спленоцитов неиммунизированных мышей при предварительном их культивировании с конъюгатами ди-, три- или тетрасахарида с биотином, иммобилизованными на планшетах, покрытых стрептавидином, а также *ex vivo* – в сыворотке крови мышей при детекции результатов с помощью проточной цитофлуориметрии. Экспрессию мембраноассоциированных молекул на мононуклеарных лейкоцитах селезенки мышей определяли путем использования меченых моноклональных антител к поверхностным маркерам иммунокомпетентных клеток с оценкой результатов методом проточной цитофлуориметрии.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Тетрасахарид, по сравнению с ди- и трисахаридом, активно взаимодействует с антителами к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3, не вступая в реакцию с антителами другой углеводной специфичности, а антитела, индуцированные к тетрасахариду, характеризуются специфичностью к капсульному полисахариду.
2. Конъюгат тетрасахарид с БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, по сравнению с адсорбированными конъюгатами ди- и трисахарид, после двукратной иммунизации мышей стимулирует образование более высокого уровня опсонизирующих антител, относящихся к иммуноглобулинам разных изотипов, и характеризуется высокой протективной активностью.
3. Молекулярно-клеточными маркерами, ассоциированными с иммуногенной и протективной активностью у мышей, иммунизированных конъюгатом дисахарид с БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, являются IL-17A, (TCR<sup>+</sup>)  $\gamma\delta$  Т-клетки и CD5<sup>+</sup> В1-клетки на фоне повышения количества клеток, экспрессирующих молекулы МНС класса II.

**Личный вклад автора в проведенное исследование** состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, включая разработку дизайна исследования, научно-информационный поиск по теме диссертации, подготовку обзора литературы, определение цели и задач исследования, проведение иммунизации животных, иммунологических и иммунохимических исследований, статистическую обработку данных, на основании которых сформулированы основные положения диссертационной работы, научно-практическая значимость исследования и выводы диссертации. Подготовка основных публикаций проведена при непосредственном участии автора.

### **Степень достоверности и апробация материалов диссертации**

Достоверность полученных результатов определяется использованием в работе современных методов иммунологических исследований, репрезентативностью выборки, адекватным статистическим анализом. Научные положения и выводы диссертации обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научной конференции с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам», посвященной 100-летию основания НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, 18-20 апреля 2019 г); XXII Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва, 24-26 ноября 2019); научной конференции молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology" в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета (Москва, 11-12 марта 2020 года); научной конференции молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology", посвященной 300-летию РАН (Москва, 30-31 марта 2021 г, устный доклад, 2-е место).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-73-30017 «Разработка фундаментальных подходов для создания на основе углеводных лигандов вакцин 3-его поколения и иммуноферментных диагностикумов для обнаружения и предотвращения клинически значимых бактериальных и грибковых инфекций» (2019-2022).

Апробация научно-квалификационной работы (диссертация) состоялась на конференции отдела иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова 27 октября 2021 г., протокол № 2.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 4 – в материалах международных конференций.

**Структура и объём работы.** Материалы диссертации изложены на 134 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 19 таблицами, 5 рисунками, 1 схемой и 1 фотографией. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 202 источника (из них – 10 отечественных и 192 зарубежных авторов).

## ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММУНОГЕННОСТИ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *Streptococcus pneumoniae* СЕРОТИПА 3 В СОСТАВЕ ПНЕВМОКОККОВЫХ ВАКЦИН

**Общая характеристика штаммов.** Инкапсулированные условно патогенные грамположительные кокковые бактерии, относящиеся к виду *S. pneumoniae*, являются причиной тяжелых инвазивных и неинвазивных заболеваний различной локализации у детей и взрослых. Большая часть штаммов пневмококка окружена полисахаридной капсулой. Капсула является основным фактором патогенности пневмококка, ингибируя комплемент-опосредованный опсонофагоцитоз и киллинг *S. pneumoniae* клетками иммунной системы организма [15]. Штаммы *S. pneumoniae* экспрессируют уникальные по своей структуре капсульные полисахариды (КП), на основе которых проводят серотипирование пневмококков [37, 86, 119].

В соответствии с химической структурой КП идентифицировано более 90 серотипов пневмококка, примерно 20 из которых, являются клинически значимыми. Особого внимания, с точки зрения микробиологических особенностей штаммов, распространённости, клинической картины заболеваний, вакцинопрофилактики и диагностики, заслуживает *S. pneumoniae* серотипа 3.

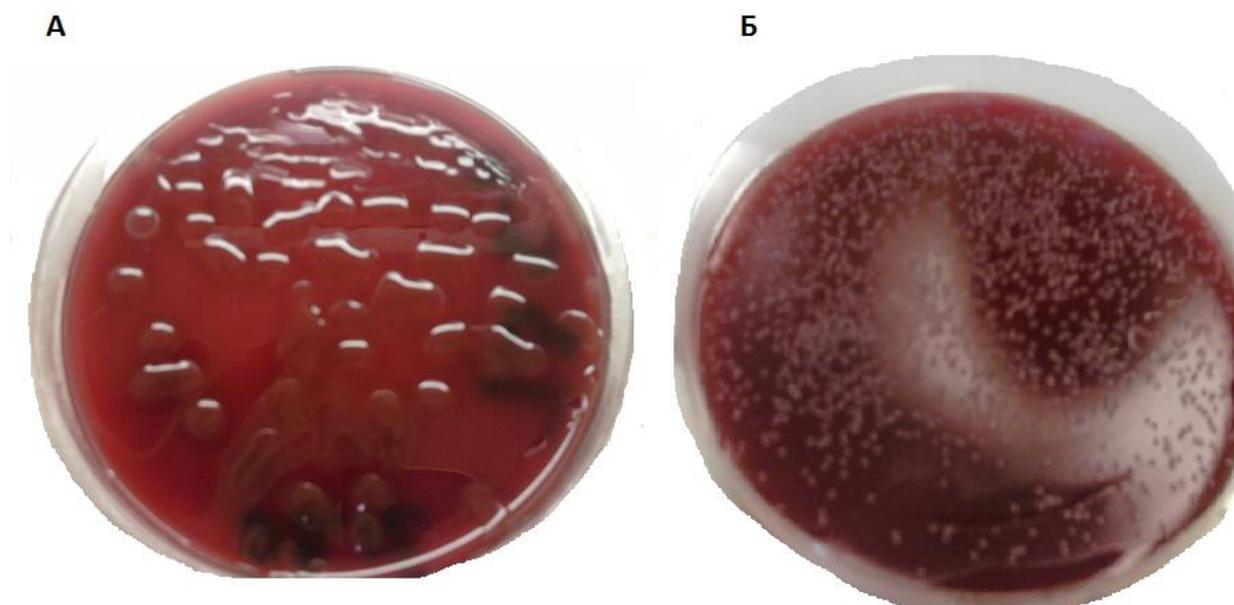
*S. pneumoniae* серотипа 3 идентифицировали одним из первых [53] независимо друг от друга L. Pasteur и G.M. Sternberg в 1881 г [141]. M. Heidelberger впервые показал, что капсула *S. pneumoniae* определяет серотиповую принадлежность пневмококка [62, 80-84].

**Серотип-3 ассоциированные заболевания.** Заболевания, вызываемые *S. pneumoniae* серотипа 3 ассоциированы с высоким риском летального исхода у детей и взрослых [68, 69, 87, 91, 122, 193] и могут вызывать

пневмонию с некрозом легочной ткани, эмпиему плевры [27, 36], а также абсцесс мозга [61].

Серотип 3 - один из доминирующих серотипов пневмококка в разных странах мира, который наиболее опасен для лиц пожилого возраста [69, 90, 136, 169].

Штаммы серотипа 3 характеризуются тенденцией образовывать при росте на агаре слизистые колонии (**Фотография**) [7, 75, 83, 133, 181].



**Фотография.** Колонии *S. pneumoniae* серотипа 3 при высеве на чашку с кровяным агаром. А) Слизистые колонии. Б) Неслизистые колонии. Фото автора, посев к.б.н. Э.Е. Романенко.

Слизеобразующие (мукоидные) штаммы *S. pneumoniae* серотипа 3 часто являются причиной инвазивных пневмококковых заболеваний у взрослых. Внебольничная пневмония, вызванная слизеобразующими штаммами, характеризуется выраженной инфильтрацией легких, менее эффективным и более длительным лечением [100]. Описаны случаи тяжелой инвазивной и внутрибольничной пневмонии молниеносного течения с

летальным исходом, вызванной слизеобразующими штаммами пневмококка серотипа 3 [136].

Показано, что одни серотипы пневмококка вызывают преимущественно инвазивные пневмококковые заболевания (серотипы 1, 4, 7F, 18C), другие – обладают тропностью к колонизации носоглотки (серотипы 3, 6B, 15B/C, 19F) [35, 106]. Серотипы с низкой инвазивной способностью ассоциированы с более высоким уровнем смертности, вызывая заболевания у иммунокомпromетированных лиц, действуя как «оппортунистические» бактерии. Серотипы с высокой инвазивной способностью часто поражают здоровых лиц, действуя как первичные патогены.

Athlin и соавт. исследовали взаимосвязь между серотипами *S. pneumoniae* и титром антител у пациентов с пневмонией пневмококковой этиологии [19]. Более высокий титр антител регистрировали у пациентов, инфицированных серотипами с тонкой капсулой и средним/высоким инвазивным потенциалом (серотипы 1, 7F, 4, 9N, 9V и 14), по сравнению с пациентами инфицированными серотипами с толстой капсулой и низкой инвазивной способностью (серотипы 3, 6B, 19A, 19F и 23F). Отсутствие или снижение нейтрализующей способности антипневмококковых антител у пациентов после выздоровления от инвазивного пневмококкового заболевания, иными словами нефункциональный антительный ответ, наблюдали у 24 из 40 пациентов (60%), инфицированных серотипами 3, 19F и 23F.

**Частота распространения** серотипов пневмококка зависит от локализации инфекции в организме пациента, географического местоположения, возраста [3, 77].

При инвазивных пневмококковых заболеваниях в Омане (июнь 2014 г - июнь 2016 г) преобладали серотипы/серогруппы 12 (8,3%), 15 (8,3%), 19F (7,6%), 3 (6,1%) и 19A (6,1%) [13]. Серотип 3 наиболее часто обнаруживали при пневмококковой пневмонии у взрослых. У взрослых пациентов с

пневмококковой пневмонией в Японии с 2011 по 2013 гг серотип 3 с постоянством обнаруживали у 15% пациентов, тогда как частота выделения серотипов 19F, 23F и 4 ежегодно снижалась [11]. При исследовании изолятов пневмококка в Японии, выделенных от 43 взрослых пациентов с летальным исходом заболевания, серотип 3 оставался доминирующим [41]. Вспышка пневмонии, вызванная *S. pneumoniae* серотипа 3, зарегистрирована в лечебно-реабилитационном центре для лиц пожилого возраста при городской больнице в г. Канэгава (Япония), в 2013 г [108]. В Корее и Испании при исследовании штаммов, выделенных из носоглотки, выявляли преимущественно серотипы 3, 6, 11, 19 и 23. Причем частота выделения серотипа 3 увеличилась в течение 7 лет наблюдения [112]. Установлено, что в США, средний отит чаще вызывали серотипы 3, 6, 14, 18, 19 и 23 [96]. В Испании при проведении обсервационного исследования в двух лечебных учреждениях у взрослых пациентов зарегистрирован 451 случай внебольничной пневмонии с бактериемией (2001-2005 – 194; 2006-2010 – 134; 2011-2014 – 123). Преобладали серотипы 3 (23,1%), 7F (14,6%), 19A (8,4%) и 1 (7,5%). Серотип 3, встречали наиболее часто у пациентов с осложнениями, развившимися в период пребывания в стационаре [58].

При оценке распространенности различных серотипов пневмококка на территории Российской Федерации исследованы 584 штамма *S. pneumoniae*, выделенные от детей в возрасте до 5 лет, проживающих в детских домах и детей, посещающих детские сады. Исследование охватывало 18 городов, входящих в состав 8 федеральных округов Российской Федерации от Дальнего Востока до Северного Кавказа. При носителстве выделено 306 штаммов *S. pneumoniae*, которые относились к серотипам 3, 9, 8, 11, 15, 18, 23, а также нетипируемым штаммам. Показано, что в различных регионах РФ при носительстве у детей в возрасте до 5 лет доминировали серотипы 3, 6, 9, 14, 19, 23; в меньшей степени – серотипы 7 и 18. У детей с острым средним отитом из 39 штаммов с наибольшей частотой (31% случаев) выделяли серотип 19. Реже обнаруживали серотипы 3 (10,2%), 14 (7,7%), 4, 6, 15, 23 (по

5,1% соответственно), 8, 9, 20, 22 (по 2,5% соответственно). При внебольничной пневмонии у детей преобладали серотипы 1, 3, 4, 6, 7, 9, 14 и 23. Распространение серотипов 3, 6, 15 и 19 у детей с пневмококковыми инфекциями также было отмечено и в других исследованиях [5, 8]. Инвазивные инфекции. Из стерильных в норме образцов крови и ткани легкого выделено 14 штаммов *S. pneumoniae*. Преобладали серотипы 19 (50%), 23 (14,3%), 1 (14,3%) и 5 (7,1%) [6].

Сведения о серотиповом пейзаже инвазивных пневмококковых заболеваний в Москве остаются достаточно скудными. В 2000-2007 годах среди штаммов *S. pneumoniae*, полученных от больных пневмококковым менингитом, во всех возрастных категориях, доминировали серотипы 3, 6 и 19. При исследовании 144 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от больных пневмококковым менингитом в возрасте от 1 месяца до 79 лет в Москве в период с 1980 по 2012 год, включая 7 культур, изолированных при летальном исходе заболевания, установлено, что они относились к 33 различным серотипам, шесть культур отнесены к нетипируемым штаммам. Ведущими серотипами являлись серотипы 1, 3, 4, 6В, 6А, 7F, 15А, 15В, 18С, 19F, на долю которых приходилось 63% исследованных штаммов. Сравнение серотипового пейзажа возбудителей, изолированных в 1980-1999 годах, со штаммами 2000-2012 годов, показало различие структуры и долевого участия доминирующих серотипов. Если среди штаммов 1980-1999 годов преобладающими серотипами (в порядке уменьшения значимости) были 1, 3, 19F, 6А, 7F, 12F, 18С, 19А, то среди культур 2000-2012 годов доминировали 3, 19F, 6В, 7F, 15А, 15В, 1, 4, 6А [1].

**Вакцинопрофилактика.** Вакцинация позволяет предотвратить инфицирование *S. pneumoniae* и уменьшить летальность от заболеваний пневмококковой этиологии. Успех вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции во многом зависит от степени соответствия серотипового состава вакцины спектру циркулирующих штаммов пневмококка. Несмотря на включение в программы иммунизации многих стран мира полисахаридных и

конъюгированных пневмококковых вакцин, количество заболеваний, вызываемых *S. pneumoniae* серотипа 3, существенно не уменьшилось, в том числе, среди привитых.

Данные об иммуногенности КП *S. pneumoniae* серотипа 3 противоречивы: одни из них свидетельствуют о его эффективности, другие – о низкой иммуногенности. В контролируемом испытании при иммунизации 249 детей в возрасте от 6 до 54 месяцев 14-валентной конъюгированной пневмококковой вакциной, во всех возрастных группах повышался уровень сывороточных антител к серотипам, входящим в состав вакцины, включая серотип 3 [54].

При проведении первой фазы клинических испытаний 20-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины, содержащей 7 новых серотипов пневмококка (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F), предназначенных для расширения спектра действия уже существующих конъюгированных вакцин (Превенар 7, Превенар 10 и Превенар 13), оценивали ее эффективность и безопасность. В контролируемом рандомизированном «слепом» исследовании участвовало 66 здоровых взрослых добровольцев в возрасте от 18 до 49 лет, не имевших в анамнезе пневмококковой инфекции. В контрольной группе испытуемым вводили комбинированную дифтерийно-столбнячную вакцину с бесклеточным коклюшным компонентом. Добровольцы хорошо переносили вакцинацию. Отмечено повышение опсонофагоцитарной активности и концентрации IgG-антител ко всем КП пневмококка, входящим в состав вакцины, через 28-35 суток после введения одной дозы вакцины [183].

Показана эффективность вакцины Превенар 13 в отношении *S. pneumoniae* серотипа 3 у пациентов старше 65 лет с внебольничной пневмонией [111].

Установлен клинический эффект действия вакцины Превенар 13 в предупреждении развития тяжелых инвазивных пневмококковых

заболеваний, вызванных *S. pneumoniae* серотипа 3, у детей от 0 до 8 лет в Италии [117].

В настоящее время накопилось значительное количество данных, свидетельствующих о недостаточной иммуногенности КП *S. pneumoniae* серотипа 3 в составе пневмококковых вакцин, и дискуссии по этому вопросу продолжаются.

Проведено 3 масштабных клинических испытания 11-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины у детей с оценкой иммунологических показателей в разные сроки наблюдения. Вакцина содержала в своем составе КП *S. pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, каждый из которых индивидуально конъюгировали с протеином D, выделенным из *Haemophilus influenzae* (коммерческое название вакцины – Синфлорикс, зарегистрирована в РФ).

Первое рандомизированное «слепое» исследование проведено с 2000 по 2002 гг в Финляндии для оценки иммуногенности конъюгированной 11-валентной пневмококковой вакцины у детей. 154 ребенка получали вакцину по трем схемам. Группа 1 (основная) - привитые 11-валентной пневмококковой вакциной в возрасте 2, 4, 6 месяцев при введении 4-ой дозы (ревакцинация) в возрасте 12–15 месяцев (стандартная схема); группа 2 (группа сравнения) - привитые 11-валентной пневмококковой вакциной в возрасте 2, 4, 6 месяцев при проведении 4-ой иммунизации 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакциной (коммерческое название Пневмо 23, зарегистрирована в РФ) в возрасте 12–15 месяцев; группа 3 - привитые вакциной против гепатита В в возрасте 2, 4, 6 месяцев при проведении 4-ой иммунизации 11-валентной пневмококковой вакциной в возрасте 12–15 месяцев (контроль). После введения 3-х доз конъюгированной вакцины существенно повышалась концентрация IgG-антител к КП серотипов, входящих в состав вакцины (от 1,26 до 4,92 мкг/мл), которая зависела от серотипа пневмококка. У детей, после первичного курса

вакцинации конъюгированной вакциной, 4-ая иммунизация 23-валентной полисахаридной вакциной (группа 2), индуцировала более высокий бустерный ответ, чем 4-ая доза конъюгированной вакцины (группа 1). А именно, концентрация IgG-антител после ревакцинации конъюгированной вакциной составляла от 1,60 до 9,63 мкг/мл, тогда как после бустерного введения полисахаридной вакцины от 4,24 до 40,54 мкг/мл, в зависимости от серотипа пневмококка. Концентрация антител после однократного введения первой дозы конъюгированной вакцины детям в возрасте 12-15 мес в группе контроля (группа 3) была ниже, чем после введения 4 дозы вакцины детям, иммунизированным до этого трехкратно этой же вакциной по стандартной схеме (группа 1). При оценке иммуногенности КП серотипа 3 у детей, прошедших первичный курс вакцинации и ревакцинацию конъюгированной 11-валентной вакциной по стандартной схеме (группа 1), титр антител к КП всех серотипов пневмококка повышался, за исключением серотипа 3. После однократного введения конъюгированной 11-валентной вакцины на втором году жизни детям, ранее не привитым против пневмококка (контроль, группа 3), происходило образование антител к серотипу 3 в концентрации, превышающей таковую у детей первого года жизни, прошедших первичный курс вакцинации (3 дозы) конъюгированной пневмококковой вакциной. Это свидетельствует о том, что иммуногенность конъюгированной вакцины у детей с возрастом повышалась, даже после однократной иммунизации. Через 15 дней после бустерной иммунизации 23-валентной полисахаридной вакциной на втором году жизни у детей, прошедших первичный курс вакцинации 11-валентной вакциной (группа 2), титр IgG-антител, индуцированных к КП серотипа 3, повышался наравне с другими серотипами пневмококка. То есть, иммунный ответ у детей на ревакцинацию очищенным КП серотипа 3 после первичного курса вакцинации конъюгированной пневмококковой

вакциной (группа 2), не был нарушен, в отличие от такового при ревакцинации конъюгированным КП (группа 1) [138].

Второе проспективное рандомизированное «двойное слепое» исследование проведено в Чехии и Словакии в период с 2000 по 2004 гг. Целью исследования явилась оценка эффективности 11-валентной конъюгированной вакцины в профилактике острого среднего отита у детей [154]. В испытании участвовало 4968 детей, которые были разделены на две группы. Первая группа (основная) получала 11-валентную конъюгированную пневмококковую вакцину по стандартной схеме - трехкратно в возрасте 3, 4, 5 мес (первичный курс вакцинации) и в 12-15 мес (ревакцинация), другая (группа контроля) – получала вакцину против гепатита А по той же схеме. Наблюдение за детьми проводили до конца второго года жизни ребенка. Эффект вакцинации оценивали по первому эпизоду заболевания и по всем эпизодам инфекции, зарегистрированным за весь период наблюдения за детьми. Через 2 недели после третьей дозы пневмококковой вакцины до возраста ребенка 24-27 месяца, выявлено 333 клинических эпизода острого среднего отита в группе привитых детей (n=2455), и 499 в контрольной группе (n=2452), что показало существенное снижение заболеваемости в группе детей, иммунизированных пневмококковой вакциной. Эффективность вакцинации в предупреждении первого эпизода острого среднего отита в группе привитых составила 52,6%; при учете всех эпизодов - 57,6%. Вакцинация способствовала снижению на 65,5% эпизодов инфекции, вызванной штаммами пневмококка, КП которых входили в состав вакцины, но существенно не влияла на возникновение заболеваний, вызванных другими серотипами пневмококка. Наибольшее количество эпизодов пневмококкового отита вызвали серотипы 3 (37 случаев), 6В (27 случаев), 14 (23 случая), 19F (67 случаев) и 23F (23 случая). В отношении всех серотипов, кроме серотипа 3, установлен существенный защитный эффект вакцинации, который варьировал от минимального - серотип 19F (44,4%) до максимального – серотип 14 (95,5%). Что касается серотипа 3, то общее

количество эпизодов острого среднего отита в группе, получавшей пневмококковую вакцину, и в контрольной группе не имело существенных различий - 20 и 17 соответственно; первый эпизод зарегистрирован в – 19 и 17 случаях соответственно; первый эпизод до ревакцинации – в 6 и 8 случаях соответственно; первый эпизод после ревакцинации – в 13 и 9 случаях соответственно. Эти данные демонстрируют недостаточную эффективность КП пневмококка серотипа 3 в составе конъюгированной пневмококковой вакцины в предупреждении острого среднего отита у детей. Все выделенные штаммы серотипа 3, кроме одного, образовывали при росте на агаре слизистые колонии. Самая высокая концентрация антител к КП (3,78 г/мл) через 1 месяц после проведения первичного курса вакцинации, выявлена к серотипу 3, однако через 1 месяц после ревакцинации наблюдали атипичную иммунологическую реакцию, проявляющаяся в том, что концентрация антител снижалась (2,84 г/мл), тогда как к другим серотипам пневмококка титр антител нарастал. Это согласуется с результатами исследования, проведенного в Финляндии [138]. Низкая опсонизирующая способность антител, индуцированных к серотипу 3, повышалась (в 1,8 раза) после ревакцинации.

Третье, открытое исследование, проведено в Словакии в 2005 г и явилось продолжением второго клинического испытания в тех же группах детей [154]. Определяли эффективность вакцинации 11-валентной конъюгированной вакциной в предупреждении острого среднего отита у детей в зависимости от концентрации IgG-антител (среднее геометрическое значение концентрации) и в реакции опсонофагоцитоза (среднее геометрическое значение разведения сыворотки). Первой группе (основная) детей, прошедших первичный курс и ревакцинацию конъюгированной вакциной в 3,5 года, вводили 23-валентную полисахаридную вакцину. Второй группе (контроль) детям, иммунизированным и ревакцинированным вакциной против гепатита А, также вводили 23-валентную полисахаридную пневмококковую вакцину в те же сроки [163]. Показано, что через 15 дней

после иммунизации 23-валентной полисахаридной вакциной титр IgG-антител к КП всех серотипов, входящих в состав 11-валентной пневмококковой вакцины, включая серотип 3, был выше, чем у детей в группе контроля и у детей, прошедших ранее как первичный курс вакцинации, так и ревакцинацию 11-валентной конъюгированной вакциной. Следует отметить, что после введения 23-валентной полисахаридной вакцины детям, прошедшим первичный курс вакцинации и ревакцинацию конъюгированной вакциной, концентрация антител к серотипу 3 была самой низкой (7,9 г/мл), тогда как для других серотипов (от 10 до 39 г/мл и выше), а у непривитых детей после введения 23-валентной полисахаридной вакцины концентрация антител к серотипу 3 была одной из самых высоких среди других серотипов (5,0 г/мл), для серотипов 1, 4, 7F и 19F (4,6–7,3 г/мл). Опсонизирующая активность антител после введения 23-валентной полисахаридной вакцины в отношении серотипа 3 была самой низкой во всех группах, прошедших курс вакцинации конъюгированной пневмококковой вакциной (865 для серотипа 3 и от 1890 до 36063 для других серотипов), в контрольной группе для серотипа 3 (518), для серотипов 5 (164) и 19F (277). Показано, что в предупреждении острого среднего отита ключевое значение имеют IgG-антитела с высокой опсонизирующей активностью [164].

Обобщая результаты клинических испытаний у детей по оценке эффективности конъюгированной 11-валентной пневмококковой вакцины, содержащей в своем составе КП серотипа 3, следует отметить несколько важных положений. Во-первых, не выявлено защиты от острого среднего отита, вызванного пневмококком серотипа 3. Во-вторых, иммунологическая эффективность вакцинации конъюгированной вакциной повышалась при проведении бустерной иммунизации полисахаридной вакциной. В-третьих, отмечено развитие атипичного иммунного ответа к КП серотипа 3 после ревакцинации конъюгированной пневмококковой вакциной при сохранении нормального иммунного ответа на бустерное введение очищенного КП, входящего в состав 23-валентной полисахаридной вакцины. В-четвертых,

специфическая опсонофагоцитарная активность является наиболее информативным тестом оценки протективной активности пневмококковых вакцин.

Еще одно подтверждение недостаточной эффективности в индукции антител к КП серотипа 3 показано при проведении постмаркетингового испытания профилактической эффективности и иммуногенности вакцин Превенар 7 (не содержит КП серотипа 3) и Превенар 13 в Англии, Уэльсе и Северной Ирландии. Для оценки эффективности противопневмококковой вакцинации в отношении инвазивных пневмококковых заболеваний определяли концентрацию серотипспецифических IgG-антител у детей после двух доз Превенар 7 (n=126) и Превенар 13 (n=237), а также титр опсонизирующих антител к КП в сыворотке крови детей. Показано, что защита от пневмококковой инфекции коррелировала с титром антител к КП. В этом исследовании также установлено, что КП серотипа 3 в составе вакцины Превенар 13 оказался недостаточно эффективным [17].

Shiramoto и соавторы показали, что иммуногенность вакцин Превенар 13 и Пневмо 23 у лиц пожилого возраста, которую оценивали по титру антител и их опсонизирующей активности, была ниже для КП серотипа 3 по сравнению с другими серотипами пневмококка [172].

При иммунизации полисахаридной пневмококковой вакциной не происходило повышения титра антител к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 у лиц старше 65 лет и взрослых лиц молодого возраста, тогда как к другим исследованным серотипам (1, 5, 6В, 8, и 14) титр антител в обеих группах возрастал [174].

На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что иммуногенность КП различных серотипов пневмококка неодинакова. Вероятно, одной из причин доминирования серотипа 3 после внедрения в практику мультивалентных пневмококковых вакцин, является низкая иммунологическая эффективность КП этого серотипа пневмококка [17].

**Экспериментальные исследования.** По мнению Choi и соавторов недостаточная иммуногенность КП серотипа 3 в составе пневмококковых вакцин может быть связана с необычным путем синтеза КП штаммами этого серотипа пневмококка [42]. В настоящее время установлен механизм синтеза КП для всех известных 94 серотипов пневмококка. Существует 2 пути синтеза КП: синтаза-зависимый и *wzy*-зависимый [39, 72, 103]. Главное различие между ними состоит в том, что при *wzy*-зависимом синтезе КП ковалентно связан с пептидогликаном клеточной стенки бактерий, тогда как при синтаза-зависимом пути он может отделяться от клеточной стенки. Для большинства серотипов *S. pneumoniae* синтез КП происходит по *wzy*-зависимому пути и только у двух серотипов (3 и 37) - по синтаза-зависимому пути [52]. *S. pneumoniae* серотипа 37 крайне редко встречается у человека, тогда как серотип 3 является клинически значимым [131]. Показано, что КП *S. pneumoniae* серотипа 3 может быть связан с бактериальной стенкой и одновременно находится в растворенном состоянии в культуральной среде [39]. Авторы работы исследовали штаммы пневмококка, синтезирующие КП двумя различными путями: по синтаза-зависимому - штаммы *S. pneumoniae* серотипа 3 и 37, по *wzy* – зависимому - штаммы *S. pneumoniae* серотипов 1, 4, 6В и 14. После культивирования собирали супернатант, не содержащий бактериальных клеток, и осадок бактерий. Определяли концентрацию КП в супернатанте и в осадке клеток с помощью реакции ингибирования ИФА. В супернатанте среднее содержание КП на  $10^7$  КОЕ для *S. pneumoniae* серотипа 3 составило 60 мкг, для *S. pneumoniae* серотипа 37 – 130 мкг, что было существенно выше, чем для КП штаммов *S. pneumoniae* серотипов 1, 4, 6В и 14 (от 0,4 до 10 мкг). Соотношение КП в системе: супернатант / осадок клеток было  $>1$  для синтеза-зависимых серотипов и  $<1$  для *wzy* – зависимых серотипов. Для доказательства того, что при инфицировании *S. pneumoniae* серотипа 3 его КП присутствует в крови мышей в свободном состоянии, проводили заражение животных серотипами 3, 4 или 5 дозой  $10^3$  микробных клеток. Через 24 ч после заражения у всех мышей развивалась бактериемия, и

число колониеобразующих единиц (КОЕ) составляло от  $6 \times 10^4$  КОЕ/мл до  $1,3 \times 10^8$  КОЕ/мл в зависимости от серотипа пневмококка. При этом в сыворотке крови для *S. pneumoniae* серотипа 3 количество КП на  $10^7$  КОЕ составило 31,2 мкг, что было существенно выше, чем для серотипов 4 и 5 (0,8 мкг). Для оценки влияния свободного КП *S. pneumoniae* серотипа 3 на антителозависимый киллинг бактериальных клеток пневмококка в реакции опсонофагоцитоза использовали супернатант культуры и мышиную сыворотку, полученную после заражения *S. pneumoniae* серотипа 3. Бактерицидная активность антител, индуцированных к КП серотипа 3, существенно снижалась в присутствии супернатанта культуры, причем с той же закономерностью, как и при прибавлении очищенного КП *S. pneumoniae* серотипа 3. В тесте пассивной защиты мышей показано, что для снижения степени защиты от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 требовалось 0,2 мкл супернатанта культуры, содержащей 0,03 мкг КП, тогда как для серотипа 4 - 25 мкл, содержащих 0,12 мкг КП серотипа 4, то есть в 4 раза больше. В настоящее время принято считать, что для человека защитная концентрация антител к КП каждого серотипа *S. pneumoniae* составляет 0,35 мкг/мл, что коррелирует с защитой при иммунизации конъюгированными вакцинами. Для КП *S. pneumoniae* серотипа 3 защитная концентрация антител была наибольшей по сравнению с другими серотипами пневмококка, входящими в состав Превенар 13, и составляла 2,83 мкг/мл. Авторы делают заключение, что *S. pneumoniae* серотипа 3 при культивировании *in vitro* и при заражении мышей высвобождает наибольшее количество КП в окружающую среду по сравнению с другими серотипами пневмококка, приводя к снижению антитело-зависимого фагоцитоза и защиты от инфекции, путем связывания свободных антител, индуцированных к КП этого серотипа пневмококка. Не исключено, что КП, с которым связались антитела, также может элиминировать с поверхности бактерии в окружающую среду, снижая защитные свойства антител.

С помощью панели из трех моноклональных антител (МкАт), полученных к КП серотипа 3, показано, что одно МкАт обладало опсонизирующей активностью в присутствии комплемента, другое - в отсутствие комплемента, третье не обладало активностью ни в присутствии, ни в отсутствие комплемента. Все антитела обладали защитной способностью при летальном интраназальном заражении мышей, однако они взаимодействовали с разными эпитопами КП [182].

КП, включая *S. pneumoniae* серотипа 3, не является лигандами Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors - TLR) [12]. Очищенный КП *S. pneumoniae* способен связываться с макрофагами через углеводраспознающий домен маннозного рецептора с последующей продукцией провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  и хемокинов [200]. Лектин С-типа (углеводсвязывающий белок) SIGN-R1 (молекула межклеточной адгезии клеток 3-захватывающего неинтегрин - Specific Intracellular Adhesion Molecule-3 Grabbing Nonintegrin Homolog-related 1 - SIGN-R1), экспрессируемый макрофагами, особенно в маргинальной зоне селезенки мыши, способен связывать КП нескольких различных серотипов *S. pneumoniae* [200].

Высокая вирулентность штаммов *S. pneumoniae* серотипа 3 позволяет использовать их для воспроизведения экспериментальной пневмококковой инфекции у животных [31,139]. Показано, что решающую роль при пневмококковой инфекции у мышей играют  $\gamma\delta$  Т-клетки, НКТ при продукции Th1 и/или Th17-цитокинов [93, 120, 135]. При инфекции количество  $\gamma\delta$  Т-клеток может значительно увеличиваться, достигая 50% от всех периферических лимфоцитов [48]. При пневмококковой инфекции  $\gamma\delta$  Т-клетки накапливаются и активируются в легких [101, 135]. Отсутствие  $\gamma\delta$  Т-клеток приводит к увеличению количества бактерий в легких и гибели животных [120, 135]. При инфекции, вызванной *S. pneumoniae* серотипов 3 и 1,  $\gamma\delta$  Т-клетки продуцировали IFN $\gamma$  и участвовали в защите от *S. pneumoniae* как в начальной фазе, так и на стадии разрешения пневмококковой

пневмонии, элиминируя мононуклеарные фагоциты из очага воспаления [101]. Большая часть  $\gamma\delta$  Т-клеток обнаруживается в барьерных тканях организма и лишь небольшая часть в крови и селезенке мышей [12, 14, 78, 179]. Активация  $\gamma\delta$  Т-клеток через TCR может быть опосредована неклассическими молекулами МНС (т. е. членами семейства T10/T22 и CD1) и не связанными с МНС молекулами [29, 60, 191]. Прямая активация  $\gamma\delta$  Т-клеток происходит под действием лектинов С-типа [123].  $\gamma\delta$  Т-клетки продуцируют широкий спектр цитокинов и проявляют цитотоксическую активность в отношении патогенов через рецепторы, индуцирующие апоптоз (FAS и TRAIL), и цитолитические белки (перфорин и гранзим) [51], а также могут быть профессиональными антигенпрезентирующими клетками, требующими взаимодействия с опсонизированными бактериальными клетками. Некоторые  $\gamma\delta$  Т-клетки экспрессируют молекулу CD4.  $\gamma\delta$  Т-клетки с фенотипом Th1 и Th2 продуцируют IL-2, IL-4, IL-17A, IFN $\gamma$  и TNF [60].

Важную роль в защите от пневмококковой инфекции [175] играют CD5<sup>+</sup> В1-клетки, которые активируются под действием Т-независимых антигенов, в том числе КП пневмококка [121, 124], продуцируя естественные антитела, а также, возможно, участвуют в Т-зависимом иммунном ответе [28, 121, 192, 202]. CD5<sup>+</sup> В1-клетки в основном присутствуют в брюшной и плевральной полостях и в очень небольших количествах в селезенке [50, 105]. Рецептор В-клеток (BCR) участвует в фагоцитозе бактерий В1-клетками [65]. CD5<sup>+</sup> В1-клетки, выделенные из селезенки, преимущественно индуцируют продукцию IL-17 Т-клетками [201]. В1-клетки представляют антиген Т-клеткам и индуцируют более эффективную их пролиферацию, чем конвенциональные CD19<sup>+</sup> В-клетки [202]. Показано, что овалбуминпрезентирующие В1-клетки экспрессируют высокий уровень МНС II по сравнению с нативными В1-клетками.

В раннем ответе на легочную инфекцию, вызванную *S. pneumoniae*, участвуют НК-клетки, посредством продукции IFN $\gamma$  [55]. Ключевую роль в защите от пневмококковой инфекции играют НКТ-клетки [93]. При

заражении *S. pneumoniae* серотипа 3, у мышей с дефицитом НКТ-клеток отмечали более высокую смертность и бактериальную нагрузку в легких, чем у контрольных мышей [99]. Вероятно, IFN $\gamma$ , продуцируемый НКТ-клетками, играет решающую роль в защите от пневмококковой пневмонии [134]. При заражении мышей *S. pneumoniae* серотипа 1 показано, что НКТ-клетки являются важными эффекторами врожденного иммунитета, обеспечивая быструю элиминацию пневмококка [93]. НКТ-клетки могут косвенно или непосредственно «помогать» В - клеткам индуцировать выработку антител [63, 64, 184] и играют решающую роль в образовании антипневмококковых антител и переключении классов иммуноглобулинов в ответ на введение пневмококковых полисахаридных вакцин [102, 127, 128].

Наряду с защитой от инфекции IL-17,  $\gamma\delta$  Т-клетки и CD5<sup>+</sup> В1-клетки могут способствовать развитию аутоиммунных процессов [28, 43, 74, 148, 180]. Экспансию аутореактивных клонов В-клеток контролирует IL-10, оставляя ВСР в состоянии анергии.

Нестандартность КП *S. pneumoniae* серотипа 3 может оказывать влияние на качество вакцин. Для устранения этого недостатка перспективным является использование протективных синтетических олигосахаридов строго определенного химического строения, являющихся аналогами КП *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированных с белком-носителем для индукции Т-зависимого иммунного ответа и иммунологической памяти [4, 12, 107, 140].

## **ГЛАВА 2. КОНЬЮГАТЫ БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ С ОЛИГОСАХАРИДАМИ – СИНТЕТИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *Streptococcus pneumoniae* СЕРОТИПА 3, И ИХ ИММУНОГЕННОСТЬ**

Современные пневмококковые вакцины, конструируют при использовании бактериальных капсульных полисахаридов (КП) актуальных серотипов пневмококка или конъюгатов КП с белком-носителем с последующим прибавлением адъюванта. КП являются Т-независимыми антигенами [32, 130]. При ковалентном связывании КП с белком-носителем получают гликоконъюгат, который в отличие от природных углеводов, индуцирует Т-зависимый иммунный ответ [23, 153]. Критерием адекватного иммунного ответа у взрослых людей в ответ на введение коммерческих пневмококковых вакцин является 2-4 кратное повышение титра антител к КП, входящим в их состав [47, 199], при титре опсопинов >1:8 [159, 160, 165, 177]

**Капсульный полисахарид пневмококка и его олигосахаридные производные.** Для получения традиционных пневмококковых вакцин КП выделяют из культуральной среды после инактивации патогена. Выделенный из культуральной среды КП, даже после очистки, содержит примесь антигенов бактериальной клетки, таких как полисахарид клеточной стенки (тейхоевая кислота или С-полисахарид), белки, нуклеиновые кислоты и др., что может служить препятствием для его последующей конъюгации с белком-носителем [166, 198]. Следует учитывать, что бактериальный КП состоит из цепей разной длины, поэтому антитела, индуцированные к одному эпитопу, могут быть протективными, а к другому - нет. Недостаточная иммунологическая эффективность КП может быть связана со смещением рамки считывания при экспрессии генов, ответственных за продукцию КП [52, 118].

Полимерные цепи КП состоят из олигосахаридных повторяющихся звеньев, представленных, например, 2-мя (серотип 3) [156] или 8-ю (серотип 17А) моносахаридами [189]. Получение олигосахаридов методом

гидролитического расщепления КП - трудноконтролируемый процесс. В результате конечный продукт является не в полной мере охарактеризованным с точки зрения длины олигосахарида и присутствия бактериальных примесей [97].

Методом частичного кислотного гидролиза нативного КП *S. pneumoniae* серотипа 3 [38] получен очищенный и иммунохимически охарактеризованный гексасахарид [176], который конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА), гемоцианином лимфы улитки (keyhole limpet hemocyanin - КНЛ) или столбнячным анатоксином (tetanus toxoid - ТТ). Мышей иммунизировали без адьюванта внутрибрюшинно КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (0,5 мкг по углеводу), конъюгатами гексасахарида с БСА (12 мкг по углеводу), гексасахарида с КНЛ (6 мкг по углеводу) или гексасахарида с ТТ (20 мкг по углеводу). Бустерные инъекции гомологичными гликоконъюгатами проводили внутрибрюшинно на 3 и 11 неделях (КП и гексасахарид-БСА) или только на 3 неделе (гексасахарид-КНЛ). Иммунизация КП приводила к образованию максимального уровня IgM-антител через 1 неделю после иммунизации, затем наблюдали их постепенное снижение. Бустерные инъекции КП не приводили к повышению IgM- и IgG-антител. Иммунизация конъюгатом гексасахарид-БСА приводила к меньшему повышению титра IgM-антител через 1 неделю после иммунизации по сравнению с КП. Последующие две бустерные инъекции не приводили к значимому повышению IgM-антител через 1 неделю после каждой иммунизации, но сопровождалась выработкой большого количества IgG-антител после второй бустерной инъекции. Первичная иммунизация гликоконъюгатом гексасахарид-КНЛ индуцировала образование низкого уровня IgM-антител. Однако через 3 недели после 1 бустерной инъекции определяли высокий уровень IgG-антител, которые присутствовали в сыворотке крови до 28 дня после иммунизации. Протективную активность гликоконъюгатов оценивали при заражении иммунизированных мышей штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3. Мышей иммунизировали

внутрибрюшинно, внутривенно и подкожно. Конъюгат гексасахарид-БСА вводили внутрибрюшинно или внутривенно, гексасахарид-КНЛ – внутрибрюшинно, гексасахарид-ТТ - внутрибрюшинно или внутривенно. Через 1 неделю после первой иммунизации мышей заражали внутрибрюшинно *S. pneumoniae* серотипа 3. В результате, КП защищал от заражения всех мышей, независимо от пути введения. Гексасахарид-БСА – защищал всех мышей, а гексасахарид-КНЛ и гексасахарид-ТТ обеспечивали лишь частичную защиту, которая не зависела от способа введения и иммунизирующей дозы гликоконъюгата. То есть, для некоторых конъюгатов было недостаточно однократной иммунизации. При оценке длительности иммунитета установлено, что КП защищал мышей от заражения вплоть до 19 недели после 1-кратной иммунизации. Длительность защиты, индуцированной конъюгатом гексасахарид-БСА, составляла всего 3 недели, однако 2 бустерные инъекции обеспечивали защиту всех иммунизированных мышей в течение 14 недель. После 1 бустерной инъекции конъюгата гексасахарид-КНЛ, проведенной через 3 недели после первой иммунизации, наблюдали защиту всех мышей от заражения в течение 23 недель. Одна бустерная инъекция конъюгата гексасахарид-ТТ обеспечивала защиту в течение 8 недель. Сыворотку иммунизированных животных переносили внутривенно неиммунизированным мышам в разных разведениях и заражали мышей через 24 ч *S. pneumoniae* серотипа 3. Показано, что сыворотка, содержащая IgM- и IgG-антитела, лучше защищала мышей от заражения, чем сыворотка, содержащая только IgM-антитела. Полученные данные свидетельствуют о том, что для выработки IgG-антител, длительно сохраняющихся в сыворотке крови мышей, имеет значение природа белка-носителя.

По данным Laferrier [110] конъюгация ТТ с олигосахаридными производными КП *S. pneumoniae* серотипа 3 с различной длиной цепи (в среднем 8, 16, 27 и 37 повторяющихся звеньев) не индуцировала достаточного иммунного ответа у кроликов. Олигосахарид-индуцированные

IgG-антитела обладали низкой опсонизирующей активностью. В данном исследовании использовали пул олигосахаридов с различной длиной цепи, что затрудняло интерпретацию результатов исследования. Эти данные согласуются с результатами предыдущих экспериментов на мышах, в которых конъюгат гексасахарида с ТТ, обеспечивал более слабую и менее длительную защиту от заражения по сравнению с использованием других белков-носителей, несмотря на иммунизацию самой большой дозой по углеводу [176].

Проведенные исследования позволяют сделать несколько важных выводов: 1) гексасахарид, конъюгированный с белком-носителем, без адьюванта, при иммунизации животных вызывает IgG-ответ и защиту от заражения только при бустерном введении; 2) иммунный ответ и его длительность зависит от использованного белка-носителя; 4) пассивная защита мышей выше при использовании сыворотки, содержащей IgG-антитела, обладающие опсонизирующей активностью; 5) метод иммунизации (подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно) не оказывает существенного влияния на иммуногенность гликоконъюгата.

**Синтетические олигосахариды и их конъюгаты с белком-носителем.** Для получения эффективной полусинтетической гликоконъюгатной вакцины необходимо синтезировать олигосахариды, имеющие протективные эпитопы, с последующей их контролируемой конъюгацией с белком-носителем [166]. В настоящее время в нескольких странах мира лицензирована гликоконъюгатная вакцина QuimiHib для защиты от гемофильной инфекции типа b, сконструированная на основе конъюгированных синтетических олигосахаридов. Полусинтетические вакцины разрабатываются и против госпитальных инфекций, вызываемых *Clostridium difficile* и *Klebsiella pneumoniae* [18, 33, 34, 170].

Протективные эпитопы КП пневмококка могут быть представлены синтетическими олигосахаридами [95]. Иммунный ответ на олигосахариды высокоспецифичный и некоторые олигосахариды, конъюгированные с

белком-носителем, индуцируют даже более высокий синтез антител к КП, чем конъюгаты с бактериальным КП [95]. В настоящее время синтезированы синтетические олигосахариды для серотипов 1-4, 6А/В, 7F, 8, 9А/У, 14, 17F, 18С, 19А/F, 22F, 23F, 27 и 29 [25, 89, 97, 171, 187].

Синтетические олигосахариды являются привлекательной альтернативной гетерогенным препаратам очищенных бактериальных КП, на основе которых получены коммерческие пневмококковые вакцины [140].

Недостаточная иммуногенность КП *S. pneumoniae* серотипа 3 [71, 146] явилась основанием для проведения углубленного анализа современных данных литературы по разработке гликоконъюгатов третьего поколения на основе синтетических олигосахаридов, соответствующих фрагментам КП этого серотипа пневмококка. Разработаны эффективные методы синтеза антигенных структур, соответствующих фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3 [194].

Дисахарид, трисахарид и тетрасахарид, соответствующие фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгировали скваратным методом с нетоксичной формой рекомбинантного дифтерийного токсина CRM<sub>197</sub> (Cross-Reactive Material - CRM) в различных соотношениях углевод/белок [26]. Мышей иммунизировали гликоконъюгатами без адьюванта подкожно в 4 точки (2,5 мкг по углеводу в расчете на мыш) и делали такую же бустерную инъекцию через 3 недели. В качестве контроля использовали CRM<sub>197</sub> и фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Через 2 недели после последнего забора крови мышей заражали внутрибрюшинно 20 LD<sub>50</sub> (400 КОЕ) *S. pneumoniae* серотипа 3. Выживаемость мышей учитывали на 14 день после заражения. Титр IgM- и IgG-антител определяли с помощью ИФА при использовании микропланшетов, с адсорбированным на дне лунок КП (1 мкг/мл). Мыши, иммунизированные конъюгатами CRM<sub>197</sub> с три- и тетрасахаридом, вырабатывали IgG-антитела, специфичные к КП. Титр антител сохранялся на высоком уровне не менее 7 недель после бустерного введения конъюгатов. Конъюгат CRM<sub>197</sub> с дисахаридом не вызвал

образования антител. Соотношение углеводов/белок не влияло на иммуногенность гликоконъюгатов. Все мыши, у которых были обнаружены антитела, специфичные к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, выжили после внутрибрюшинного заражения штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3. Контрольные мыши погибли в течение 4 дней наблюдения. Не выявлено влияния количества олигосахаридных лигандов, связанных с одной молекулой белка, на иммуногенность гликоконъюгатов.

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы: 1) конъюгат CRM<sub>197</sub> с дисахаридом без адъюванта не вызывает иммунного ответа даже при бустерном введении; 2) соотношение углеводов/белок в гликоконъюгате не влияет на его иммуногенность; 3) для индукции иммунного ответа необходимо использовать дозу гликоконъюгата в расчете на углеводов. Кроме того, иммуногенные олигосахаридные эпитопы должны иметь определенную конформацию и оптимальную длину.

В другом исследовании при использовании метода скрининга на панели углеводов лигандов определяли сайты распознавания КП с помощью двух моноклональных антител (МкАт), специфичных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 [140]. Оба МкАт распознавали нативный КП *S. pneumoniae* серотипа 3. При сравнении двух трисахаридов разной структуры и тетрасахарида, оба МкАт лучше всего связывались с тетрасахаридом, с которым и были проведены дальнейшие исследования [185, 142, 143]. Конъюгат CRM<sub>197</sub> с тетрасахаридом содержал в среднем 6 олигосахаридов на одну молекулу CRM<sub>197</sub>. Мышей иммунизировали подкожно с интервалом 28 дней двумя дозами конъюгата тетрасахарид-CRM<sub>197</sub> (5 мкг по углеводу) с адъювантом Фрейнда или алюминия гидроксидом. Контрольная группа мышей получала ФСБ. Иммунизированные мыши вырабатывали IgG-антитела, которые специфично связывались с тетрасахаридом. Сыворотка иммунизированных мышей содержала антитела, как к белку-носителю, так и к спейсеру. Иммуногенность конъюгированного тетрасахарида в значительной степени зависела от использованного адъюванта. Активность

антител к конъюгату CRM<sub>197</sub> с тетрасахаридом оценивали с помощью опсонофагоцитоза [158, 159, 182]. Для этого к клеткам линии промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 прибавляли диметилформамид и через 6-7 дней получали нейтрофилоподобные клетки. Микробные клетки *S. pneumoniae* серотипа 3 инкубировали с сывороткой неиммунизированных мышей (контроль) или мышей, иммунизированных конъюгатом тетрасахарид-CRM<sub>197</sub>, и затем добавляли к дифференцированным HL-60 клеткам в присутствии комплемента. Через 1 час, оставшиеся живыми клетки *S. pneumoniae* серотипа 3, высевали на чашки с питательной средой и подсчитывали количество образовавшихся колоний (КОЕ). Сыворотка, полученная от мышей, иммунизированных конъюгатом тетрасахарид-CRM<sub>197</sub>, приводила к дозозависимому киллингу фагоцитами клеток пневмококка, что свидетельствовало об образовании опсонизирующих антител. Адьювант Фрейнда вызвал образование более высокого титра антител с наибольшей опсонизирующей активностью, по сравнению с использованием алюминия гидроксида в качестве адьюванта. Протективную активность конъюгата тетрасахарида в отношении пневмококковой пневмонии исследовали на модели интраназального заражения мышей [157, 195]. Так как адьювант Фрейнда не используют при создании вакцин, авторы вводили гликоконъюгат, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, и без адьюванта. Мышей иммунизировали трехкратно (дни 0, 14 и 28) конъюгатом тетрасахарид-CRM<sub>197</sub>, содержащим 5 мкг тетрасахарида на дозу. Контрольных мышей и мышей, иммунизированных конъюгатом тетрасахарид-CRM<sub>197</sub>, заражали интраназально на 35 день 10<sup>6</sup> КОЕ *S. pneumoniae* серотипа 3. Результат оценивали по клиническим признакам заболевания (потеря веса, температура тела) в течение 48 ч. Иммунизация мышей конъюгатом тетрасахарид-CRM<sub>197</sub>, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, значительно снижала активность инфекционного процесса, о чем судили по более низкой температуре тела мышей и меньшей потере веса; сохранению целостности альвеолярного барьера, которую

оценивали по уменьшению соотношения альбумина в бронхоальвеолярной лаважной жидкости к его содержанию в плазме крови; снижению количества бактерий в легких по сравнению с контролем и введением гликоконъюгата без адъюванта. Более того, иммунизация гликоконъюгатом с адъювантом практически полностью предотвращала развитие бактериемии по сравнению с контролем и гликоконъюгатом без адъюванта. Антибактериальная защита сопровождалась увеличением количества лейкоцитов и снижением продукции цитокинов в альвеолярном компартменте у инфицированных пневмококком мышей. Индукция длительного иммунитета является важным показателем успешной вакцинации. Через 4 мес защита от инфекции была меньше, чем при заражении на 35 день после иммунизации. Авторы считают, что ограниченная способность конъюгата тетрасахарид-CRM<sub>197</sub> индуцировать длительный иммунный ответ, может быть не связана со свойствами олигосахарида.

Иммунологическая оценка конъюгатов пента-, гекса-, гепта- и октасахаридов, соответствующих фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3, со столбнячным анатоксином (tetanus toxoid - ТТ) показала, что они вызывают образование IgG-антител. При этом длина олигосахаридной цепи оказывает существенное влияние на их иммунологические свойства. Пента- и гексасахариды определены как перспективные антигены для разработки вакцин [197]. Эти исследования были продолжены. Показано, что индуцированные гликоконъюгатами антитела распознают КП *S. pneumoniae* серотипа 3 и активируют опсонофагоцитоз. Конъюгат гексасахарид-ТТ защищал мышей от инфекции, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3. Вероятно, что конъюгат гексасахарид-ТТ активирует CD4<sup>+</sup> Т-клетки и способствует дифференцировке Т-клеток в углеводспецифичные Th2-клетки для индукции гуморального иммунного ответа. В заключение следует отметить, что авторы рассматривают конъюгат гексасахарид-ТТ как перспективный кандидат для создания вакцины против *S. pneumoniae*

серотипа 3 [59]. Однако сравнительного исследования с конъюгированным тетрасахаридом в этом исследовании не проводили.

**Поливалентные комбинированные и неогликоконъюгатные вакцины.** В настоящее время появилась возможность получать синтетические олигосахариды, соответствующие фрагментам КП различных серотипов пневмококка. Активная иммунизация мышей и кроликов конъюгатами, на основе синтетических олигосахаридов, соответствующих фрагментам КП серотипа 2 [57], серотипа 3 [140], серотипа 5 [116], серотипа 8 [167] и серотипа 14 [107, 145, 161] приводила к образованию опсонизирующих антител. В некоторых исследованиях показана протективная активность неогликоконъюгатов на модели заражения животных.

Предпринята попытка оптимизации лицензированных поливалентных конъюгированных пневмококковых вакцин на основе КП *S. pneumoniae* путем прибавления конъюгированных синтетических олигосахаридов, соответствующих фрагментам КП, серотипы которых не входят в состав вакцин. Наряду с этим разработана формула полусинтетической пентавалентной гликоконъюгатной вакцины, содержащей исключительно конъюгированные синтетические олигосахариды [98]. Для расширения спектра действия коммерческих пневмококковых вакцин в их состав включили серотипы, не входящие в состав вакцины Превенар 13 (серотипы 2 и 8), и вакцины Синфлорикс (серотип 3), а также проблемные серотипы 3 и 5, содержащиеся в коммерческих вакцинах, но обладающие низкой иммуногенностью или нестандартными химическими характеристиками. Синтетический тетрасахарид широко распространенного серотипа 14, являющийся повторяющимся звеном КП этого серотипа [107] использовали для того, чтобы показать, что иммуногенные КП могут быть заменены синтетическими аналогами. Полученные авторами гликоконъюгаты, относящиеся к серотипам 2, 3, 5, 8, 14, содержали от 7 до 11 олигосахаридов на одну молекулу CRM<sub>197</sub>. Кроликов NZW иммунизировали подкожно в

объеме 100 мкл традиционными вакцинами с добавлением неогликоконъюгатов (syn): Превенар 13 + серотип 2(syn) + серотип 8(syn) или Синфлорикс + серотип 2(syn) + серотип 3(syn) + серотип 8(syn) (2,2 мкг по углеводу для каждого олигосахариды) в дни 0, 14 и 28. Титр антител определяли с помощью ИФА на 7 сутки после иммунизации. Полученные комбинированные вакцины вызывали выраженный иммунный ответ, однако титр антител был ниже, чем при иммунизации каждым из компонентной вакцины в отдельности. Комбинированная вакцина вызывала образование антител, специфичных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Фагоцитарная активность клеток линии HL-60 в присутствии сывороток к отдельным компонентам вакцины, была ниже по сравнению с сывороткой к комплексному препарату. Пентавалентная полусинтетическая конъюгированная вакцина содержала 5 гликоконъюгатов с синтетическими олигосахаридами (2,2 мкг по углеводу), соответствующих фрагментам КП пяти серотипов (2, 3, 5, 8, 14) пневмококка, адсорбированных на 125 мкг алюминия гидроксида в ФСБ. Для оценки ее иммуногенности использовали 6 самок NZW кроликов, которых иммунизировали 0,5 мл пентавалентной вакцины. Отрицательным контролем служил CRM<sub>197</sub>, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, положительный контроль – Превенар 13 или Синфлорикс подкожно по такой же схеме (дни 0, 14 и 28). После последней иммунизации в сыворотке, полученной от каждого кролика, определяли титр антител к КП в ИФА. Пентавалентная вакцина индуцировала образование высокого уровня антител, специфичных к соответствующим КП. Титр антител, специфичных к КП штамма серотипа 2, индуцированный 5-валентной вакциной, был сопоставим с эффектом комбинированных вакцин: Превенар13 + серотип 2(syn) + серотип 8(syn) и Синфлорикс + серотип 2(syn) + серотип 3(syn) + серотип 8(syn), тогда как специфичных к КП серотипа 8 - был несколько ниже. Серотип 3, входящий в состав в Превенар 13, индуцировал образование антител так же как конъюгированный

олигосахарид в составе 5-валентной вакцины и комбинированной вакцины Синфлорикс + серотип 2(syn) + серотип 3(syn) + серотип 8(syn).

КП серотипа 5, включенный в состав коммерческих пневмококковых вакцин, характеризуется тем, что его структура частично изменяется в процессе получения, приводя к снижению иммуногенности [116]. В составе полусинтетической 5-валентной вакцины конъюгированный олигосахарид, соответствующий КП серотипа 5, вызвал более сильный иммунный ответ у кроликов, чем бактериальный КП, входящий в состав вакцин Превенар 13 и Синфлорикс. Интересно, что более низкий титр IgG-антител наблюдали в ответ на введение неогликоконъюгата серотипа 14 в составе 5-валентной полусинтетической вакцины по сравнению с коммерческими вакцинами. Оценку антитело-зависимого фагоцитоза проводили при использовании пуловой сыворотки иммунизированных кроликов и сравнивали с активностью стандартной человеческой референс-сыворотки к капсульным антигенам (007sp), рекомендованной ВОЗ [67]. Показано, что полусинтетические и коммерческие конъюгированные вакцины, содержащие неогликоконъюгаты, вызывали образование антител, усиливающих фагоцитоз пневмококка соответствующего серотипа клетками линии HL-60.

Для оценки формирования иммунологической памяти NZW кроликов (n=3-6) иммунизировали подкожно исследуемыми препаратами на 91 день после последней иммунизации. Титр IgG-антител определяли до бустерного введения гликоконъюгатов (день 119) и через 7 суток после бустерного введения (день 126). После бустерного введения всех исследованных гликоконъюгатов титр антител в ИФА существенно повышался. Сывороточные антитела обладали высокой опсонизирующей активностью. Следует отметить, что пентавалентная полусинтетическая вакцина запускала продукцию антител, обладающих более высокой опсонизирующей активностью, чем вакцины Превенар 13 и Синфлорикс [144]. Полученные результаты показали возможность включения неогликоконъюгатов в состав коммерческих вакцин.

Таким образом, коммерческие пневмококковые вакцины на основе КП различных серотипов пневмококка могут быть оптимизированы двумя способами: 1) с помощью расширения спектра их протективной активности путем прибавления к ним гликоконъюгатов на основе синтетических олигосахаридов, относящихся к серотипам, не входящим в состав вакцин; 2) при замене неогликоконъюгатами проблемных КП пневмококка, относящихся к серотипам 1 и 5, которые подвергаются необъяснимой химической модификации в ходе их получения из культуральной среды при выращивании бактерий [116, 168].

### **Влияние адъювантов на иммунный ответ к неогликоконъюгатам**

О влиянии адъювантов на иммуногенность гликоконъюгатов на основе синтетических олигосахаридов, соответствующих фрагментам КП пневмококка известно мало. Использование алюминия гидроксида является предпочтительным по сравнению с алюминием фосфатом. Гель алюминия гидроксида при нейтральном рН имеет положительный заряд. Это способствует лучшей адсорбции на нем отрицательно заряженных конъюгатов CRM<sub>197</sub> – олигосахаридов, соответствующих фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3 [114].

Адъюванты в комбинации с вакцинами способствуют снижению иммунизирующей дозы и количества инъекций, тем самым уменьшая количество побочных эффектов вакцинации [46]. Действие адъювантов приводит к модуляции иммунного ответа на корпускулярные антигены путем создания эффекта депо, направленно действуя на клетки иммунной системы или увеличивая продукцию определенных цитокинов [73, 129]. Адъюванты могут изменить баланс Th1/Th2 цитокинов и, как следствие, генерацию соответствующих субклассов антител. У мышей продукция IgG1-антител ассоциирована с Th2-ответом, тогда как Th1-ответ ассоциирован с продукцией IgG2a-, IgG2b- и IgG3- антител [109]. Каждый субкласс иммуноглобулинов может участвовать в клиренсе инкапсулированных бактерий с помощью различных механизмов. IgG2a и IgG2b обладают

способностью образовывать наиболее сильную связь с Fc рецепторами клеток иммунной системы [155] и вместе с IgG3 лучше фиксируют комплемент, чем IgG1 [137]; IgG3 может связываться с бактериями [70] и обеспечивать защиту от инфекции [30, 125]. То есть, иммунный ответ с выработкой IgG-антител различных изотипов, может быть полезен для создания защиты против инкапсулированных бактерий. Развитие иммунного ответа по Th1 пути направляют адьюванты такие как: неметилованные CpG-мотивы ДНК бактерий (цитозин-фосфат-гуанин –cytosine-phosphate-guanin- CpG) [49, 85, 94]; диметил диоктадецил аммоний бромид (dimethyl dioctadecyl ammonium bromide - DDA) [88]; QuilA - сапонин, экстрагируемый из коры южно-американского дерева *Guillaja saponaria* [190]; монофосфорилил липид А (monophosphorilyl lipid A–MLP) [24]. По Th2-пути - Al(OH)<sub>3</sub> (гидроксид алюминия) [196]. Прибавление к конъюгированным КП адьювантов, таких как QuilA [15] и монофосфорилил липида А (monophosphorilyl lipid A – MLP) усиливали иммунный ответ к КП пневмококка у мышей.

Для исследования роли адьювантов в иммунном ответе использовали слабо иммуногенный лиганд трисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированный с CRM<sub>197</sub>. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно дозой 0,5 мкг по углеводу, в 4 точки в присутствии различных адьювантов (QuilA, CpG, MPL, DDA, алюминия гидроксида и их комбинаций). Через 5 недель вводили бустерную дозу гликоконъюгата без адьюванта. В качестве положительного контроля использовали конъюгаты CRM<sub>197</sub>-трисахарид (2,5 мкг по углеводу) и CRM<sub>197</sub>-КП серотипа 3 (2,5 мкг по углеводу) без адьюванта [110]. Отрицательным контролем служили конъюгаты CRM<sub>197</sub> с КП гетерологичных серотипов пневмококка без адьюванта, которые вводили мышам в дозе 2,5 мкг по углеводу: CRM<sub>197</sub>-КП серотипа 6А, CRM<sub>197</sub> - КП серотипа 6В или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Все группы мышей, иммунизированные 1-кратно конъюгатом CRM<sub>197</sub>-трисахарид в присутствии различных адьювантов, индуцировали продукцию

одинакового уровня анти-КП IgG-антител в течение более 32 недель. Через 2 недели после бустерного введения гликоконъюгатов определяли avidность антител к КП серотипа 3 в ИФА при использовании натрия тиоцианата, субизотипы IgG-антител и их опсонизирующую активность. Avidность сывороточных антител к КП после введения конъюгата CRM<sub>197</sub>-трисахарид была выше при использовании в качестве адъювантов QuilA или QuilA+MPL, чем при введении неогликоконъюгата без адъюванта. Во всех группах мышей, иммунизированных гликоконъюгатом с адъювантом (кроме групп с DDA и CpG), avidность антител была выше, чем при иммунизации конъюгатом CRM<sub>197</sub> – трисахарид без адъюванта. Бустерная инъекция конъюгата CRM<sub>197</sub>-трисахарид повышала уровень IgG-антител в большинстве исследуемых групп. Использование адъювантов DDA+CpG и QuilA способствовало существенному увеличению уровня Th1 опосредованных IgG2a-, IgG2b- и IgG3- антител к КП серотипа 3 по сравнению с группами, иммунизированными только CRM<sub>197</sub>-трисахарид и CRM<sub>197</sub>-КП серотипа 3 без адъюванта. В присутствии сывороток мышей, иммунизированных гликоконъюгатами с адъювантами DDA+CpG и QuilA, усиливался фагоцитоз бактериальных клеток пневмококка серотипа 3 по сравнению с использованием сывороток мышей, иммунизированных конъюгатами CRM<sub>197</sub>-трисахарид и CRM<sub>197</sub>-КП серотипа 3 без адъюванта. Через 4 недели после последней иммунизации мышей заражали внутрибрюшинно 20 летальными дозами (400 КОЕ) *S. pneumoniae* серотипа 3. Из них 98% (n=82) мышей, у которых определяли антитела к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, выжили после заражения, тогда как все мыши, входящие в состав контрольных групп, погибли в период между 2 и 4 сутками после заражения.

Обычно алюминия гидроксид прибавляют к антигенам вакцины в расчете 0,5 мкг/доза (на основе содержания иона алюминия). ВОЗ допускает ≤ 1,25 мг/доза. Показано, что в дифтерийно-столбнячном анатоксине доза

алюминия 0,133 мг/доза и 0,5 мг/доза индуцируют одинаковый иммунный ответ против дифтерии и столбняка [79].

Таким образом, независимо от природы адъюванта у всех мышей, иммунизированных гликоконъюгатом с адъювантом, определяли длительно циркулирующие антитела, специфичные к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, обеспечивающие полную защиту от заражения этим серотипом пневмококка. Все исследованные адъюванты увеличивали уровень антител, специфичных к КП и опсонизирующую способность антител. Фагоцитарная активность имела высокую степень корреляции с Th1-ассоциированными IgG2a- и IgG2b-антителами, в меньшей степени с Th2-ассоциированными IgG1-антителами, обладавшими меньшей степенью avidности. Авторы считают, что повышение иммуногенности конъюгатов с олигосахаридами может быть достигнуто при использовании Th1-адъювантов, которые целесообразно включать в состав будущих вакцин.

Молекулярно-клеточный механизм действия гликоконъюгатов исследован недостаточно. Известно, что иммунизация гликоконъюгатами, в отличие от Т-независимых очищенных полисахаридов, требует помощи Т-клеток для активации антителопродуцирующих В-клеток, переключения синтеза IgM на синтез углеводспецифических IgG-антител, индукции В- и Т-клеточной памяти [20, 126]. В последние годы произошел существенный прогресс в понимании действия гликоконъюгатов на иммунную систему организма, объясняющий индукцию IgG-антител к углеводной составляющей гликоконъюгатов и формированию В- и Т-клеточной памяти.

Традиционная гипотеза активации иммунитета с помощью гликоконъюгатных вакцин предполагает, что только пептид, генерированный антигенпрезентирующими клетками из гликоконъюгата, может быть представлен для распознавания Т-клеткам. Это точка зрения игнорирует ковалентную связь углевода с белком-носителем, которая вряд ли может быть разрушена в эндосомах [21, 22]. Коротко, современный механизм действия гликоконъюгатов можно представить следующим образом. В-

клетка захватывает гликоконъюгат через углеводраспознающий рецептор (B Cells Receptor - BCR) и процессирует в гликан-пептид в эндосомах. Пептидная часть гликан-пептида связывается с МНС класса II, а гликановая часть презентруется TCR CD4<sup>+</sup>T-карбогидратных клеток (*Tcarbs*). Стимулированные *Tcarbs* секретируют IL-2, IL-4 для индукции углеводспецифического адаптивного иммунного ответа с переключением синтеза IgM на IgG и формированием иммунологической памяти.

### **Заключение к обзору литературы**

Показано, что профилактический эффект капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 зависит от типа вакцины, нозологической формы заболевания, возраста, схемы иммунизации.

Рассмотрены экспериментальные данные, обосновывающие низкую иммуногенность капсульного полисахарида серотипа 3, предположительно связанную с необычным путем синтеза его капсульного полисахарида.

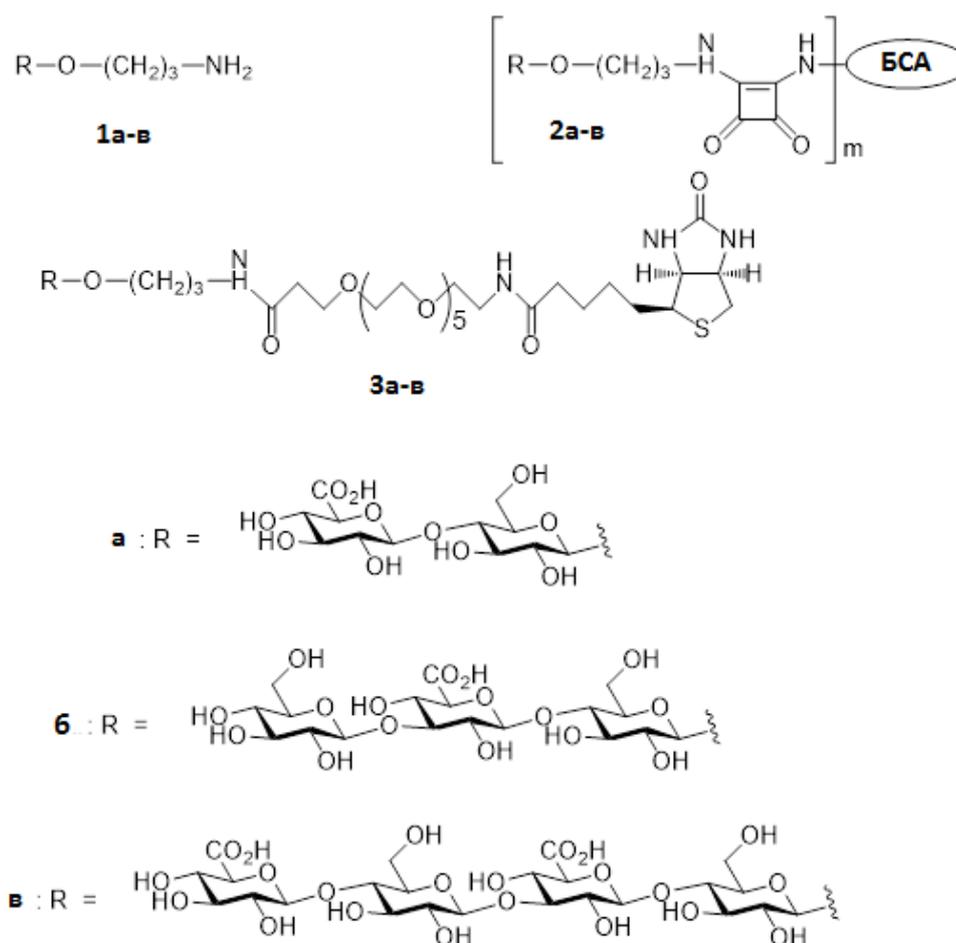
Синтетические олигосахариды с точной химической структурой являются привлекательной альтернативной гетерогенным препаратам очищенных бактериальных КП. На их основе могут быть разработаны поливалентные полусинтетические пневмококковые вакцин.

## ЧАСТЬ II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ГЛАВА 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 1.1. Препараты

Синтетические олигосахариды и их конъюгаты с белком носителем.  
Олигосахариды, соответствующие одному (дисахарид), полутора (трисахарид) и двум (тетрасахарид) повторяющимся звеньям КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (**Схема.1**) получены в ФГБУН ИОХ им. Н.Д.Зелинского РАН (лаборатория гликоконъюгатов, заведующий лабораторией, член-корреспондент РАН, д.х.н., проф., Н.Э.Нифантьев).



**Схема 1.** Структура олигосахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 и их конъюгатов.

**Примечание:** а) дисахарид, б) трисахарид; в) тетрасахарид; 1 а-в) спейсер; 2 а-в) конъюгаты олигосахаридов с БСА; 3 а-в) конъюгаты олигосахаридов с биотином.

Для иммунизации животных олигосахариды конъюгировали с БСА скваратным методом. Для идентификации антител в ИФА использовали конъюгаты олигосахаридов с биотином, полученные путем ацилирования соответствующих 3-аминопропилгликозидов с активированным эфиром, которые иммобилизовали на пластике планшетов, покрытых стрептавидином [9].

БСА часто используют в качестве белка-носителя при изготовлении конъюгатов и других типов биомолекулярных систем [16]. Методом MALDI-TOF анализа установлено, что конъюгаты ди-, три- и тетрасахарида с БСА содержали в среднем 19, 18 и 16 олигосахаридных лигандов на одну молекулу белка соответственно. Содержание углеводов в препаратах составило 9, 13 и 15% соответственно [9, 186].

Бактериальный капсульный полисахарид получен в лаборатории иммунохимической диагностики ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова (зав. лабораторией д.м.н., проф. Н.Е. Ястребова) из штамма *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 №10196, выделенного 30 июня 2011 года из крови ребенка с бактеремией в отделении микробиологии Научного центра детского здоровья МЗ РФ. Штамм *S. pneumoniae* серотипа 3 выращивали на полусинтетической питательной среде. КП получали из среды культивирования штамма. Этапы выделения КП включали: ультрафильтрацию и концентрирование, обработку ферментами, фенольную депротеинизацию и диализ. Полученный препарат содержал менее 5% денатурированного белка и менее 1% нуклеиновых кислот, основную долю составляли углеводы. Специфичность КП установлена с помощью ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ) и методом ингибирования ИФА. В первом случае КП давал «ракету» с гипериммунной кроличьей сывороткой к серотипу 3, во втором - в дозе 1 мкг/мл вызывал 100% ингибирование ИФА с той же сывороткой в рабочем разведении 1:6400-1:12800 [2]. Подлинность КП серотипа 3 подтверждена с помощью ЯМР-спектromетрии.

Конъюгированная 13-валентная пневмококковая вакцина Превенар 13 (фирма “Pfizer”, США, зарегистрирована в России). Одна доза вакцины (0,5 мл) содержит КП *S. pneumoniae* серотипов (1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 23F - по 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В – 4,4 мкг, адсорбированных на алюминии фосфате - 0,125 мг). КП конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В настоящем исследовании Превенар 13 использовали в качестве референс-препарата в разовой иммунизирующей дозе 1,1 мкг/мышь по КП серотипа 3, что эквивалентно ½ дозы, рекомендуемой для человека.

Гель алюминия гидроксида (Sigma, США) – использовали в качестве адьюванта для конъюгированных олигосахаридов.

### **1.2. Лабораторные животные**

Мыши линии BALB/с (самцы) (n=250) массой 14-16 г из питомника НЦ биомедицинских технологий (филиал «Андреевка»). Животных содержали в виварии в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Условия содержания, забора крови и вывод из эксперимента соответствовал требованиям Европейского союза по уходу и использованию лабораторных животных. Протоколы экспериментов утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

### **1.3. Получение иммунных сывороток**

Пуловую сыворотку мышей, иммунизированных дозой 20 мкг/мышь (по углеводу) конъюгатами ди-, три-, тетрасахаридов с БСА и КП- CRM<sub>197</sub> (1,1 мкг/мышь по КП в вакцине Превенар 13), получали от 6 мышей/конъюгат. Сыворотку использовали для определения изотипов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 методом ИФА; в реакции ингибирования ИФА; в реакции антитело-зависимого фагоцитоза; в реакции агглютинации на стекле.

Гипериммунные сыворотки получали после многократной иммунизации кроликов инактивированными микробными клетками *S. pneumoniae* серотипа 3 и использовали в реакции ИФА, ингибирования ИФА, агглютинации на стекле. Сыворотки получены на базе лаборатории

иммунохимической диагностики ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. В работе использованы сыворотки кроликов к *S. pneumoniae* серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 14, 19F, 23F; к некоторым грамотрицательным и грамположительным бактериями: *Haemophilus influenzae* типа b №1095, *Klebsiella pneumoniae* K16 № 2069-79, *Staphylococcus aureus* №1986, *Escherichia coli* K-87.

#### **1.4. Иммунизация мышей**

Мышей иммунизировали двукратно внутрибрюшинно конъюгатами БСА с ди-, три- и тетрасахаридом, адсорбированными на геле алюминия гидроксида (Sigma–Aldrich Co., США) с интервалом 14 суток. Разовая доза гликонъюгатов, разведенных в 0,9% растворе натрия хлорида составляла (20-10-5-2,5) мкг в расчете на углевод. Гель алюминия гидроксида добавляли из расчета 250 мкг на одну иммунизирующую дозу и выдерживали в течение ночи при  $t = 4^{\circ}\text{C}$ . Такую же схему иммунизации использовали при введении референс-препарата - КП-CRM<sub>197</sub>, входящего в состав 13-валентной пневмококковой вакцины Превенар 13 и адсорбированного на геле алюминия фосфата. Вакцинацию Превенар 13 проводили разовой дозой 1,1 мкг/мышь по КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (эквивалентна  $\frac{1}{2}$  дозы, рекомендуемой для человека). Кровь получали из хвостовой вены мышей через 14 суток после последней иммунизации и определяли титр IgG1-антител методом ИФА у каждой иммунизированной мыши. В качестве иммобилизованного на дне лунок планшетов антигена использовали биотинилированные олигосахариды или КП *S. pneumoniae* серотипа 3.

#### **1.5. Определение титров антител в сыворотках крови иммунизированных мышей в ИФА**

Титры антител, индуцированные к конъюгированным с БСА ди-, три- и тетрасахариду, а также КП-CRM<sub>197</sub> определяли при использовании 96-луночных планшетов, покрытых стрептавидином (Pierce®, Thermo Scientific Inc., США) со связывающей способностью 5 пмоль биотина на лунку.

Реакцию проводили в соответствии с инструкцией производителя. Для этого в лунки стрептавидиновых планшетов после 3-кратного промывания ФСБ (Sigma, США) с 0,05% Tween 20 (PanReac Applichem, Барселона, Испания) и 0,1% БСА (Sigma, США) прибавляли 15 пмоль конъюгированных с биотином ди-, три и тетрасахаридов в объеме 100 мкл/лунка. Инкубировали в течение 2 часов при встряхивании (300 об/мин) при температуре 20-22 °С. После этого каждую лунку трижды промывали 200 мкл промывочного буфера. Сыворотки разводили, начиная с 1:100 до 1:6400 с двукратным шагом и добавляли в каждую лунку. Планшеты инкубировали 30 минут при температуре 20-22 °С. Каждую лунку трижды промывали 200 мкл промывочного буфера и прибавляли вторичные анти-кроличьи IgG-антитела или анти-мышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой: IgM (мю-цепь), IgG1 (гамма-1-цепь), IgG2a (гамма-2a-цепь), IgG2b (гамма-2b-цепь), IgG3 (гамма-3-цепь) (Rockland Immunochemicals, Inc., Pottstown, PA, США). После 30 мин инкубации при встряхивании (300 об/мин) при температуре 20-22 °С лунки промывали три раза 200 мкл промывочного буфера. Затем прибавляли 100 мкл/лунка 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с последующей инкубацией в течение 15 минут при температуре 20-22 °С. Титры антител к КП в мышинных сыворотках крови после иммунизации гликоконъюгатами определяли при использовании 96-луночных планшетов (Biochemical LTD, Москва, Россия), с иммобилизованным на дне лунок очищенным КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (0,5 мкг/лунка). Время инкубации с сывороткой составляло 1 ч при 37 °С, после прибавления вторичных антител – 1 ч при 37 °С, ТМБ прибавляли на 20 мин, реакцию в обоих случаях останавливали 1 М раствором серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) продуктов реакции определяли с помощью микропланшетного ИФА-ридера (iMark, Bio-Rad, Осака, Япония) при длине волны 450 нм. Титры антител представляли в виде разведения сыворотки или трансформировали значения в  $\log_{10}$ .

### **1.6. Антигенсвязывающая способность антител, индуцированных к гликоконъюгатам**

Способность мышинных антител, индуцированных к конъюгатам ди-, три- и тетрасахаридов с БСА и КП *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированным с CRM<sub>197</sub> (Превенар13), а также антител в сыворотках кроликов, иммунизированных инактивированными микробными клетками *S. pneumoniae* серотипа 3, связывать исследуемые олигосахаридные гаптены и КП исследовали в реакции ингибирования ИФА. На дне лунок стрептавидиновых планшетов (Thermo Scientific, США) иммобилизовали биотинилированные олигосахариды 15 п/моль в расчете на лунку. После прибавления исследуемой иммунной антисыворотки в объеме 90 мкл/лунка, добавляли олигосахаридные лиганды или КП в концентрациях 0,1-1,0-10 мкг/мл в объеме 10 мкл. В качестве контроля к исследуемым образцам сывороток прибавляли 10 мкл ФСБ. Инкубацию с антигенами проводили в течении 30 мин при температуре 20-22 °С. Затем планшеты трижды промывали 200 мкл/лунка лунку ФСБ с 0,05% Tween 20,0 и 0,1% БСА (промывочный буфер). После этого прибавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой: анти-мышинные IgG1 антитела (Rockland Immunochemicals, США) или анти-кроличьи IgG антител (Thermo Scientific, США). Планшеты инкубировали 30 мин при 20-22 °С и затем трижды промывали 200 мкл/лунка промывочного буфера. После этого прибавляли 100 мкл ТМБ для окрашивания продуктов реакции. Через 15 минут реакцию останавливали 1 М раствором серной кислоты в объеме 50 мкл/лунка. Оптическую плотность (ОП) определяли на спектрофотометре (iMark, Япония) при длине волны 450 нм. При использовании КП в качестве антигена, иммобилизованного на дне лунок планшетов, реакцию проводили по такой же схеме, но инкубирование с лигандами проходило в термостате при 37 °С в течение 1 часа, со вторичными антителами – 45 мин при 37 °С. ОП<sub>450</sub> продуктов реакции определяли, как описано выше.

Результаты представляли по IC<sub>50</sub> (50% – ингибирующая концентрация, уменьшающая ОП в 2 раза). За 100% принимали ОП<sub>450</sub> в контроле при прибавлении ФСБ к сыворотке вместо антигенов.

### **1.7. Агглютинация на стекле**

Для исследования взаимодействия антител, специфичных к олигосахаридной части конъюгатов, с капсулой живых бактерий пневмококка использовали штамм *S. pneumoniae* серотипа 3 № 3 (Центр коллективного пользования ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Штамм имел типичные для пневмококка культуральные, морфологические и биохимические свойства, не продуцировал оксидазу и каталазу, был чувствителен к оптохину, лизировался желчными кислотами, давал положительную реакцию с пневмококковыми типовыми диагностическими сыворотками к *S. pneumoniae* серотипа 3 (Statens Serum Institut, Дания). Культивирование штамма проводили на плотной сердечно-мозговой среде (BD BBL™, США) с добавлением 5% дефибринированной донорской крови в течение 24 ч. Взаимодействие иммунной сыворотки с микробными клетками оценивали по 4-х крестной системе: ++++ – образование отчетливо различимых крупных хлопьев; +++ – крупные и мелкие хлопья; ++ – мелкие хлопья; + – хлопья почти невидимы; - хлопья отсутствуют. В качестве положительного контроля использовали кроличьи серотиповые пневмококковые антисыворотки на латексе к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Statens Serum Institut, Дания).

### **1.8. Антитело-зависимый фагоцитоз (опсонофагоцитоз)**

Опсонизирующую активность антител, индуцированных к гликоконъюгатам, определяли методом проточной цитофлуориметрии [144]. Инактивированные ацетоном бактериальные клетки *S. pneumoniae* серотипа 3 окрашивали изоцианатом флюоресцина (FITC). К FITC-меченым бактериям (10<sup>9</sup> клеток/мл) прибавляли сыворотку (10 мкл) от неиммунизированных мышей (n=6) или исследуемые антисыворотки (10 мкл) от мышей (n=6 в

группе для каждого гликоконъюгата), вакцинированных дважды каждым из гликоконъюгатов (20 мкг по углеводу), или вакциной Превенар 13 (1,1 мкг по КП *S. pneumoniae* серотипа 3), полученные через две недели после второй иммунизации. Группы для исследования включали: (1) инактивированные FITC-меченные бактерии без сыворотки (контроль); (2) инактивированные FITC-меченные бактерии, обработанные нативной сывороткой (группа сравнения); или (3) инактивированные FITC-меченные бактерии, обработанные антисывороткой к каждому гликоконъюгату. Сыворотки и антисыворотки добавляли к бактериям в соотношении 1:1, а затем инкубировали в течение 20 мин при 37 °С и промывали центрифугированием (2500 g в течение 10 мин) в среде RPMI-1640 (Sigma, США). Определяли количество нейтрофилов и моноцитов (%) в периферической крови мышей-доноров (n=10), захвативших FITC-меченные бактерии. Результат оценивали с помощью проточного цитофлуориметра (Cytomix FC-500, Beckman Coulter, США, с программным обеспечением СХР). Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания и размера клеток; в каждом гейте оценивали 10000 клеток. Результат представляли, как процент нейтрофилов или моноцитов, захвативших инактивированные ацетоном FITC-меченные бактериальные клетки *S. pneumoniae* серотипа 3.

### **1.9. Протективная активность гликоконъюгатов**

Мышей линии BALB/c (самцы) дважды иммунизировали конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА (8 мышей в каждой группе) в дозах от 20 до 2,5 мкг по углеводу на мышь с интервалом 14 суток. В качестве препарата сравнения мышам (n = 6) вводили Превенар 13 в разовой дозе 1,1 мкг из расчета на КП *S. pneumoniae* серотипа 3 по той же схеме. Контролем служили мыши, которым вводили 0,9% раствор натрия хлорида. После 2-недельного перерыва животных заражали внутрибрюшинно  $10^4$  КОЕ *S. pneumoniae* серотипа 3 в объеме 0,5 мл (5,6 LD<sub>50</sub>). Результат оценивали на 16 сутки после заражения.

### **1.10. Контроль содержания бактериального эндотоксина в гликоконъюгатах с помощью ЛАЛ-теста**

Содержание эндотоксина в гликоконъюгатах определяли хромогенным ЛАЛ-тестом по конечной точке в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» 42-0062-07. Результат оценивали в единицах эндотоксина (ЕЭ). Содержание эндотоксинов в конъюгатах ди-, три- и тетрасахаридов с БСА составляло 0,08-0,11 ЕЭ/мл. Исследование проведено в испытательной лаборатории ООО «НПО «ЛАЛ-Центр», г. Москва, Россия.

### **1.11. Индукция цитокинов биотинилированными олигосахаридами *in vitro***

Для количественного определения продукции цитокинов *in vitro* использовали метод, описанный ранее [104]. Интактных мышей линии BALB/c (n=6) выводили из эксперимента под эфирным наркозом, селезенки стерильно удаляли и пропускали через пластиковый фильтр в асептических условиях. После этого клетки дважды центрифугировали при 1000g в течение 5 минут, эритроциты удаляли лизирующим буфером (0,15 М NH<sub>4</sub>Cl, 0,01 М NaHCO<sub>3</sub>, и 0,1 мМ EDTA; pH 7,4), затем осадок клеток дважды промывали средой RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 2 мМ глутамина, 100 МЕ/мл пенициллина и стрептомицина, 15 мМ HEPES и 50 мМ 2-меркаптоэтанола. Подсчет клеток проводили с использованием гемоцитометра, а жизнеспособность клеток определяли, используя метод окраски трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Результаты показали наличие  $\geq 95\%$  жизнеспособных клеток. Клетки ( $2,5 \times 10^5$  клеток/лунка в полной среде RPMI-1640) добавляли в лунки планшетов, покрытых стрептавидином, на которых предварительно иммобилизовали биотинилированные олигосахариды. Супернатант собирали через 24 ч после инкубации при 37 °C во влажной камере с атмосферой 5% CO<sub>2</sub>/ 95% воздуха. Супернатант хранили при температуре (-20) °C до постановки реакции. Количественное содержание цитокинов определяли в супернатанте клеток с помощью набора реагентов FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10-plex Kit (eBioscience, США), содержащего бусы, покрытые моноклональными

антителами к цитокинам (IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, GM-CSF, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ). Постановку реакции проводили в соответствии с инструкцией производителя методом проточной цитофлуометрии (FC-500, Beckman Coulter, США). Результаты сравнивали с уровнем цитокинов в супернатанте клеток, полученном из лунок планшетов, покрытых стрептавидином, без иммобилизации на их поверхности биотинилированных олигосахаридов.

### **1.12. Продукция цитокинов у мышей *ex vivo***

Концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей определяли методом проточной цитофлуометрии (FC-500, Beckman Coulter, США). Использовали набор реагентов FlowCytomix Mouse Th1/Th2 Kit 14-plex (eBioscience, США). Набор содержал бусы, покрытые моноклональными антителами к цитокинам (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ). Оценку концентрации цитокинов проводили на 1 и 7 сутки после первой и второй внутрибрюшинной иммунизации мышей гликоконъюгатами.

### **1.13. Экспрессия поверхностных молекул на мононуклеарных клетках селезенки мышей**

Мононуклеарные клетки получали из селезенки мышей на 1 и 7 сутки после первой и второй иммунизации, проведенной с интервалом 14 суток. Иммунизацию мышей проводили конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным и не адсорбированным на геле алюминия гидроксида. Суспензию спленоцитов получали путем гомогенизации селезенки при пропускании через одноразовый шприц с нейлоновой сеткой и суспендировали в ФСБ. Для окрашивания спленоцитов использовали анти-мышинные моноклональные антитела конъюгированные с фикоэритрином (PE) или флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC): CD3e-FITC, CD4-FITC, CD8a-FITC,  $\gamma\delta$ T ( $\gamma\delta$  TCR-PE), CD19-FITC, CD5-PE, NK.1.1, CD25-PE и MHCII-PE (I-EK) (eBioscience, San Diego, CA, США); Treg: 405 CD4-Alexa Fluor (Caltag Laboratories, США); FoxP3-FITC (eBioscience, США) и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Затем эритроциты удаляли с помощью лизирующего

буфера (BioLegend, США). После промывания ФСБ образцы фиксировали фиксирующим раствором (BioLegend, США) и анализировали с помощью проточного цитофлуометра (Cytomix FC-500, Beckman Coulter, США с программным обеспечением СХР). Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания и размера клеток; в каждом гейте оценивали 10000 клеток. Результат представляли в проценте клеток, экспрессирующих соответствующую поверхностную молекулу.

Во всех исследованиях, проведенных методом проточной цитофлуориметрии, исследовали пуловые сыворотки или пул мононуклеарных лейкоцитов мышей в 4 гейтах.

**1.14. Определение антител к двуспиральной ДНК** проводили методом ИФА при иммобилизации на твердой фазе коммерческого препарата нативной ДНК, полученной из спермы лосося (Bochringer GmbH, Германия). Препарат вносили в лунки планшетов в концентрации 20 мкг/мл, в карбонат-бикарбонатном буфере. Для анализа использовали сыворотки к гликоконъюгатам в разведениях от 1:10-1:1280. Контролем служила сыворотка неиммунизированных мышей [10]. Сыворотки инкубировали в течение 2-х часов при 37 °С, а затем 16-20 часов при 4-10 °С. В качестве вторичных антител использовали анти-мышинные IgG-антитела, меченые пероксидазой. Продукты реакции окрашивали ТМБ. Реакцию останавливали через 10-20 мин., добавляя 1 М раствор серной кислоты. Результаты учитывали на многоканальном автоматическом фотометре (Titertech Multiscan MC фирмы Flow Laboratories, Англия) при длине волны 490 нм. (лаборатория иммунохимической диагностики ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).

#### **1.15. Статистический анализ**

Результаты представляли средним значением  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Для оценки различий между сравниваемыми группами использовали критерий Манна-Уитни для независимых выборок.

Выживаемость мышей после заражения оценивали с помощью точного критерия Фишера. Значения  $P \leq 0,05$  считали статистически значимыми. Программное обеспечение Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, США).

## **ГЛАВА 2. АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОСАХАРИДОВ, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ФРАГМЕНТАМ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *S. pneumoniae* серотипа 3**

Наличие общих антигенных детерминат у синтезированных олигосахаридов и КП *S. pneumoniae* серотипа 3 определяли в трех вариантах постановки опытов: 1) по способности антител (АТ), индуцированных к КП серотипа 3, взаимодействовать с биотинилированными ди-, три- и тетрасахаридами, иммобилизованными на твердой фазе в ИФА; 2) по способности лигандов олигосахаридов блокировать связывание антител, индуцированных к КП, с иммобилизованным на твердой фазе КП или биотинилированными олигосахаридами в реакции ингибирования ИФА; 3) по способности антител, индуцированных к олигосахаридной части конъюгатов, взаимодействовать с КП или биотинилированными олигосахаридами, иммобилизованным на твердой фазе, в реакции ингибирования ИФА.

### **2.1. Специфичность распознавания антителами к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 биотинилированных ди-, три- и тетрасахаридов**

Специфичность связывания IgG-АТ, индуцированных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, с биотинилированными ди-, три- и тетрасахаридами, иммобилизованными на планшетах, покрытых стрептавидином, исследовали методом ИФА в гипериммунной сыворотке кроликов, полученной путем многократной иммунизации животных инактивированными бактериальными клетками *S. pneumoniae* серотипа 3. Контролем служила сыворотка неиммунизированных кроликов. В качестве референс-сывороток использовали гипериммунные сыворотки кроликов, полученные к гетерологичным серотипам *S. pneumoniae* и некоторым грамположительным и грамотрицательным бактериям (*табл. 1*).

**Таблица 1.** Специфичность взаимодействия антител, индуцированных у кроликов к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, с биотинилированными олигосахаридами

Сыворотки к различным серотипам <i>S. pneumoniae</i> и другим видам бактерий	Обратный титр IgG-АТ в ИФА на соответствующем антигене, иммобилизованном на твердой фазе, log <sub>10</sub> , M±SD			
	дисахарид-биотин	трисахарид-биотин	тетрасахарид-биотин	гомологичный КП
	1	2	3	4
<i>S. pneumoniae</i> серотип 1	< 2,0	< 2,0	< 2,0	4,1±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 2	< 2,0	< 2,0	< 2,0	2,6±0,2 (ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 3	< 2,0	2,6±0,2*	3,2±0,2*	3,2±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 4	< 2,0	< 2,0	< 2,0	4,1±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 5	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	4,4±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 6А	2,3±0,2	< 2,0	< 2,0	3,5±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 6В	2,3±0,2	2,0±0,1	2,0±0,1	3,5±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 14	< 2,0	< 2,0	< 2,0	3,2±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 19F	2,0±0,1	2,3±0,2	2,0±0,1	4,4±0,2(ИФА)
<i>S. pneumoniae</i> серотип 23F	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	3,8±0,2(ИФА)
<i>H.influenze</i> типа b	< 2,0	2,0±0,1	< 2,0	3,8±0,2(ИФА)
<i>K.pneumoniae</i> K16	2,0±0,1	2,0±0,1	< 2,0	3,5±0,2(РПГА)
<i>E.coli</i> K-87	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,6±0,2(РПГА)
<i>S.aureus</i> №1986	2,0±0,1	< 2,0	2,3±0,2	3,2±0,2(РПГА)
Контроль	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1

**Примечание.** Контроль – нативная сыворотка кроликов. Титр IgG-АТ определяли в одной и той же пуловой сыворотке кроликов (n=2) для каждого серотипа пневмококка и других видов бактерий в 4-х кратных повторах. M±SD. Тест Манна-Уитни. Достоверность различий между титром АТ в сыворотке к *S. pneumoniae* серотипа 3 и другими исследованными сыворотками, \* P < 0,05.

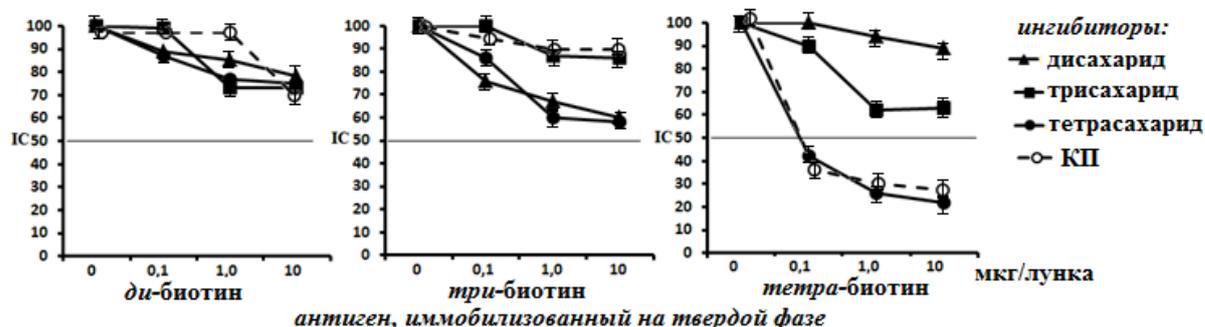
С помощью биотинилированного тетрасахарида в сыворотке крови кроликов в высоком титре ( $\log_{10} = 3,2$ ) ( $P < 0,05$ ) выявляли IgG-АТ, индуцированные к бактериальным клеткам *S. pneumoniae* серотипа 3, что соответствовало титру АТ, определяемых с помощью КП, иммобилизованного на твердой фазе. Конъюгат биотина с трисахаридом выявлял АТ в той же сыворотке в более низком титре ( $\log_{10} = 2,6$ ) ( $P < 0,05$ ), тогда как биотинированный дисахарид оказался непригодным для оценки уровня АТ ( $\log_{10} < 2,0$ ). В сыворотках к *S. pneumoniae* гетерологичных серотипов (1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 14, 19F, 23F), а также в сыворотках к *H. influenzae* типа b, *K. pneumoniae*, *E. coli* и *S. aureus* титр IgG-АТ составлял ( $\log_{10} 2,0 - 2,3$ ), что не отличалось от контрольных значений ( $\log_{10} = 2,0$ ) при тестировании с помощью всех биотинилированных олигосахаридов.

## **2.2. Способность лигандов олигосахаридов взаимодействовать с антителами к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3**

Исследовали способность лигандов блокировать связывание IgG-АТ к КП в антибактериальной сыворотке кроликов и в сыворотке мышей, иммунизированных конъюгатом CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13), с биотинилированными олигосахаридами или КП *S. pneumoniae* серотипа 3, иммобилизованными на твердой фазе методом ингибирования ИФА.

При использовании в качестве покрывающих лунки антигенов конъюгатов биотина с ди-, три- и тетрасахаридом, лиганды ди- и трисахарида характеризовались слабой способностью блокировать связывание АТ в антибактериальной кроличьей сыворотке независимо от использованного биотинилированного олигосахарида, иммобилизованного на стрептавидиновых планшетах (*Рис.1*). В системе антибактериальная сыворотка кроликов / биотинилированный тетрасахарид выявлена способность лиганда тетрасахарида связывать IgG-АТ к КП, так же как очищенный бактериальный КП *S. pneumoniae* серотипа 3 ( $IC_{50} = 0,1$

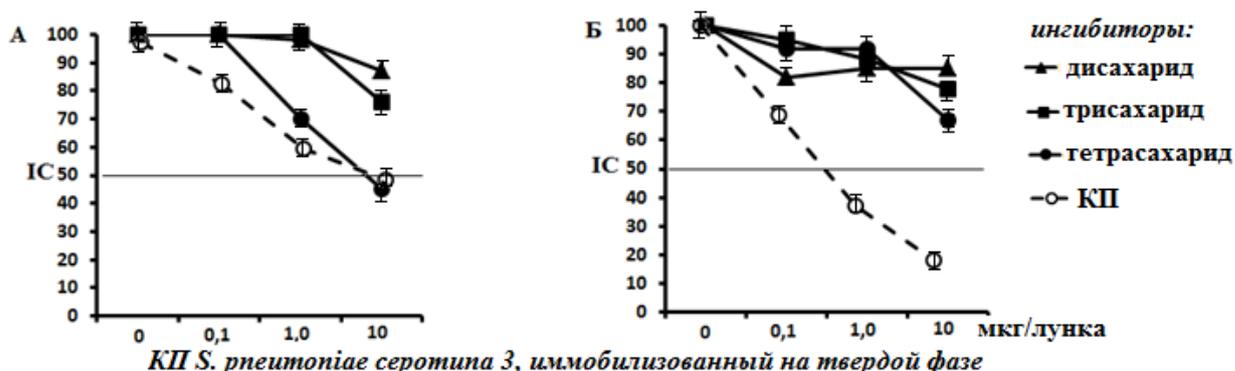
мкг/лунка). Таким образом, наиболее высокой антигенной активностью обладал тетрасахарид.



**Рис.1.** Блокирование лигандами связывания IgG-АТ в антибактериальной сыворотке кроликов с биотинилированными олигосахаридами, иммобилизованными на твердой фазе, в реакции ингибирования ИФА.

**Примечание.** Для биотинилированных ди- и трисахарида, иммобилизованных на стрептавидиновой плашке, разведение сыворотки - 1:200; для конъюгата биотина с тетрасахаридом 1:1200. IC<sub>50</sub> – концентрация лиганда, вызывающая снижение оптической плотности продуктов реакции на 50%. Каждый образец пуловой иммунной сыворотки кроликов (n=2) исследовали в 4-х повторах. M±SD.

В системе антибактериальная сыворотка / бактериальный КП, абсорбированный на дне лунок планшетов, только лиганд тетрасахарида обладал ингибирующей активностью, сопоставимой с активностью КП *S. pneumoniae* серотипа 3, в максимальной из испытанных концентраций (10 мкг/лунка) (**Рис.2 А**).



**Рис.2.** Блокирование лигандами взаимодействия IgG-АТ, индуцированных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, с иммобилизованным на твердой фазе КП, в реакции ингибирования ИФА.

**Примечание.** А) Антибактериальная сыворотка кроликов (n=2). Б) Сыворотка мышей (n=6), иммунизированных вакциной Превенар 13, содержащая CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Каждый образец пуловой иммунной сыворотки исследовали в 4-х повторах. M±SD.

Лиганды ди- и трисахарида не взаимодействовали с антителами в этой концентрации, и их ингибирующая активность не достигала  $IC_{50}$ . В этом исследовании также показана наибольшая антигенная активность тетрасахарида.

При использовании сыворотки к КП *S. pneumoniae* серотипа 3, полученной при иммунизации мышей конъюгатом CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13), ингибирующей активностью обладал только КП. Ингибирующая активность всех исследованных лигандов, даже в концентрации 10 мкг/лунка не достигала  $IC_{50}$  (**Рис. 2 Б**).

Различия между связыванием АТ с лигандами в антибактериальной сыворотке и в сыворотке к КП, входящему в состав пневмококковой вакцины, могут быть обусловлены различиями в строении активных центров антител, определяемых конформационной структурой КП, использованного для иммунизации животных: в одном случае нативного бактериального, в другом – подвергнутого химической модификации в процессе получения вакцины.

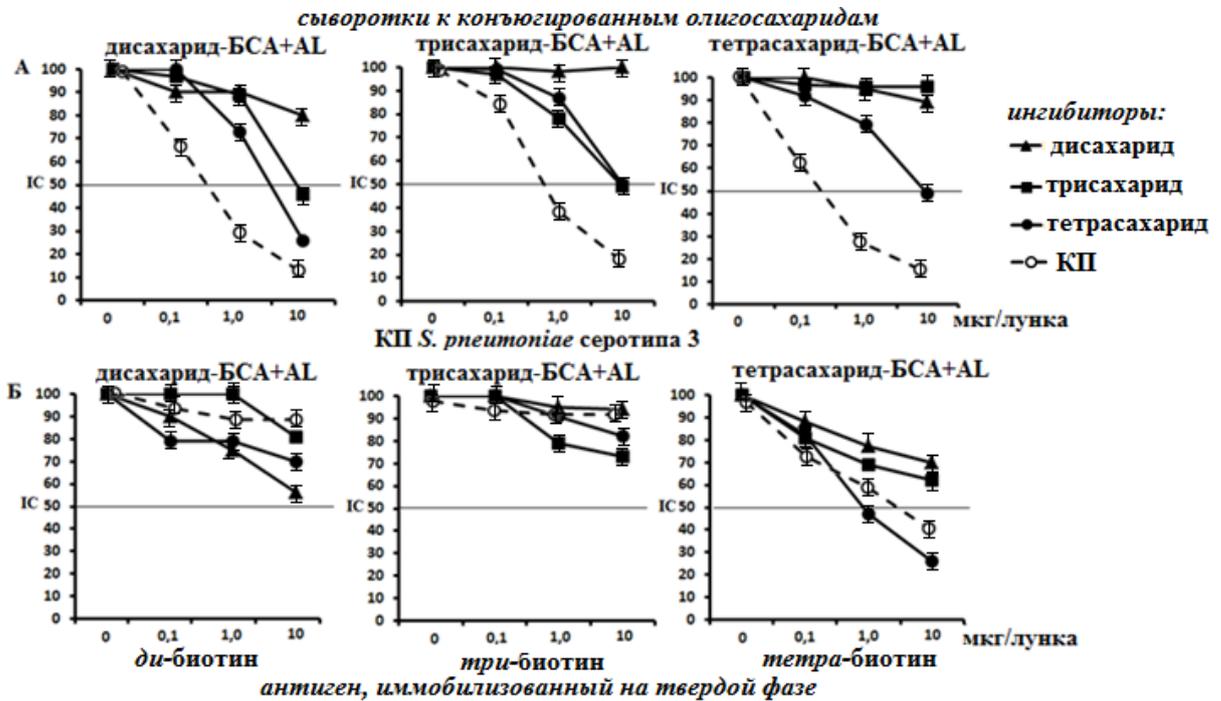
В результате проведенного исследования установлено, что тетрасахарид имеет общие иммунологически активные антигенные структуры с капсульным полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 3.

### **2.3. Способность олигосахаридспецифических антител взаимодействовать с капсульным полисахаридом**

В опытах по исследованию способности лигандов ди-, три- и тетрасахарида конкурентно связывать АТ, индуцированные у мышей к олигосахаридной части конъюгатов, в качестве антигена в твердофазном ИФА использовали КП или биотинилированные олигосахариды (**Рис. 3**).

В системе сыворотка к конъюгатам олигосахаридов с БСА / КП, иммобилизованный на твердой фазе, самой высокой способностью блокировать связывание IgG1-АТ с КП обладал лиганд тетрасахарида, который взаимодействовал со всеми олигосахаридспецифическими

антителами. Лиганд трисахарида обладал меньшей ингибирующей активностью. Дисахарид не обладал достаточной ингибирующей активностью (*Рис. 3А*).



**Рис.3.** Блокирование лигандами взаимодействия мышинных олигосахаридспецифических IgG1-АТ с КП или биотинилированными олигосахаридами, иммобилизованными на твердой фазе в реакции ингибирования ИФА.

**Примечание.** AL – алюминия гидроксид. Для получения сывороток мышей двукратно иммунизировали гликоконъюгатами (20 мкг по углеводу), адсорбированными на геле алюминия гидроксида. **А)** КП *S. pneumoniae* серотипа 3, иммобилизованный на твердой фазе. Разведение сывороток к конъюгированным олигосахаридам: дисахарид-БСА+AL – 1:400; трисахарид-БСА+AL – 1:800; тетрасахарид-БСА+AL – 1:3000. **Б)** Биотинилированные олигосахаридами, иммобилизованные на твердой фазе. Разведение сыворотки к конъюгированным олигосахаридам: дисахарид-БСА+AL – 1:500; трисахарид-БСА+AL – 1:500; тетрасахарид-БСА+AL – 1:1000. IC<sub>50</sub> – концентрация лиганда, вызывающая снижение оптической плотности продуктов реакции на 50%. Каждый образец сыворотки мышей (n=6) исследовали в 4-х повторах. M±SD.

Только лиганд тетрасахарида и КП *S. pneumoniae* серотипа 3 взаимодействовали с АТ, индуцированными конъюгатом тетрасахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, при условии иммобилизации на твердой фазе биотинилированного тетрасахарида (*Рис. 3Б*). Лиганды ди- и трисахарида вызывали слабое ингибирование во всех исследованных сыворотках независимо от биотинилированного олигосахарида, иммобилизованного на твердой фазе.

Проведенные исследования показали, что тетрасахарид, по сравнению с ди- и трисахаридом, активно взаимодействует с антителами к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3, не вступая в реакцию с антителами другой углеводной специфичности, а антитела, индуцированные к тетрасахариду, характеризуются специфичностью к капсульному полисахариду.

### **ГЛАВА 3. ИЗОТИПЫ ОПСОНИЗИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ, УГЛЕВОДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ К КОНЬЮГИРОВАННЫМ ОЛИГОСАХАРИДАМ, И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕОГЛИКОКОНЬЮГАТОВ**

#### **3.1. Выбор дозы и схемы иммунизации**

Для выбора иммунизирующей дозы и схемы иммунизации мышей использовали конъюгат БСА с дисахаридом – повторяющимся звеном КП *S. pneumoniae* серотипа 3. В предыдущих исследованиях показано, что дисахарид, обладал слабой антигенной активностью, по сравнению с тетрасахаридом. Использование конъюгата дисахарид-БСА позволяло оценить влияние адъюванта на образование антител и протективную активность.

Мышей иммунизировали конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным и неадсорбированным на геле алюминия гидроксида (250 мкг/доза). Конъюгат вводили мышам в дозах 5-10-20 мкг (по углеводу). Титр IgG1-АТ углеводной специфичности в пуловых сыворотках мышей определяли через 7 и 14 суток после однократной и двукратной внутрибрюшинной иммунизации, проведенной с интервалом 2 недели (*табл. 2*). Определение АТ IgG1 изотипа обосновано тем, что алюминия гидроксид поляризует иммунный ответ преимущественно по Th2 типу, приводя к выработке противовоспалительных цитокинов, способствующих переключению синтеза IgM на IgG1 [188].

Однократная иммунизация мышей гликоконъюгатом с адъювантом и без адъюванта, оказалась недостаточной для образования АТ даже при использовании наибольшей из иммунизирующих доз – 20 мкг/мышь по углеводу.

Конъюгат дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, индуцировал образование АТ ( $\log_{10} 2,4$ ) к олигосахаридной части конъюгата через 7 суток после 2-ой иммунизации только в ответ на введение наибольшей из испытанных доз (20 мкг по углеводу) ( $P < 0,05$ ); через 14

суток титр IgG1-АТ ( $\log_{10}$  3,2) повышался ( $P < 0,05$ ). Введение дозы 10 мкг вызывало меньшее повышение уровня антител ( $\log_{10}$  2,4) ( $P < 0,05$ ), а доза 5,0 мкг не индуцировала образования антител у мышей, даже в присутствии адъюванта, на 14 сутки после иммунизации.

Титр IgG-антител к белку-носителю (БСА) при иммобилизации на твердой фазе БСА (0,2 мкг/лунка) составил  $\log_{10}$  3,5-3,8 (данные не представлены).

**Таблица 2.** Уровень IgG1-АТ углеводной специфичности, индуцированных конъюгатом дисахарид-БСА, неадсорбированным и адсорбированным на геле алюминия гидроксида, в зависимости от дозы и кратности иммунизации

№№ группы	Гликоконъюгат	Срок исследования	Иммунизирующая доза, мкг на мышь (по углеводу) / титр IgG1-АТ трансформирован в $\log_{10}$		
			5,0	10,0	20,0
1	Дисахарид-БСА (без адъюванта)	7 суток после 1-ой иммунизации	< 2,0	< 2,0	2,0±0,1
		14 суток после 1-ой иммунизации	< 2,0	2,0±0,1	2,0±0,1
		7 суток после 2-ой иммунизации	< 2,0	< 2,0	< 2,0
		14 суток после 2-ой иммунизации	< 2,0	< 2,0	< 2,0
2	Дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида	7 суток после 1-ой иммунизации	< 2,0	2,0±0,1	2,0±0,1
		14 суток после 1-ой иммунизации	< 2,0	2,0±0,1	2,0±0,1
		7 суток после 2-ой иммунизации	< 2,0	< 2,0	2,4±0,2*
		14 суток после 2-ой иммунизации	2,1±0,1	2,4±0,1*	3,2±0,2*
3	Контроль	до иммунизации	< 2,0	-	-

**Примечание.** Пуловую сыворотку иммунизированных мышей (n=6 в каждой группе) исследовали в 4-х повторах. В качестве антигена, иммобилизованного на твердой фазе в ИФА, использовали КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (0,5 мкг/лунка). Тест Манна-Уитни. M±SD. Достоверность различий с контролем, \*  $P < 0,05$ .

Конъюгат без адьюванта не индуцировал образование АТ специфичных к КП даже через 14 суток после 2-ой иммунизации.

При исследовании протективной активности конъюгата дисахарид-БСА использовали двукратную схему иммунизации дозой 20 мкг по углеводу, которая вызывала наибольшее повышение титра антител к КП, иммобилизованному на твердой фазе в ИФА (*табл.3*).

**Таблица 3.** Протективная активность конъюгата дисахарид-БСА, адсорбированного и неадсорбированного на геле алюминия гидроксида, при заражении мышей летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3

Гликоконъюгат	Титр IgG1-АТ к КП, log <sub>10</sub>	Количество выживших мышей из числа взятых в опыт, дни наблюдения					
		1	2	3	4	16	Выжило/ всего (%)
Дисахарид-БСА (без адьюванта)	<2,0	13/20	3/20	3/20	3/20	3/20	3/20 (15%)
Дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида	2,9	19/20	18/20	18/20	18/20	18/20*	18/20 (90%)
Контроль заражающей дозы (10 <sup>5</sup> м.к.) <i>S. pneumoniae</i> серотипа 3№3	<2,0	9/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20 (0%)

**Примечание.** Представлены суммарные результаты двух опытов. Мышей иммунизировали двукратно внутрибрюшинно конъюгатом дисахарид-БСА разовой дозой 20 мкг по углеводу. Титр IgG1-АТ углеводной специфичности определяли методом ИФА на 14 сутки после второй иммунизации и трансформировали значения в log<sub>10</sub>. В качестве антигена в твердофазном ИФА использовали КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Через 2 недели после второй иммунизации мышей заражали летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3. Контрольным мышам вводили 0,9% NaCl. Точный критерий Фишера. Достоверность различий по сравнению с контролем и конъюгатом без адьюванта, \*  $P < 0,001$

В результате исследования установлено, что конъюгат дисахарид-БСА без адьюванта не обладал протективной активностью и не индуцировал выработку IgG-антител, тогда как конъюгат, адсорбированный на геле

алюминия гидроксида, стимулировал образование антител, специфичных к КП и защищал 90% мышей от заражения штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3.

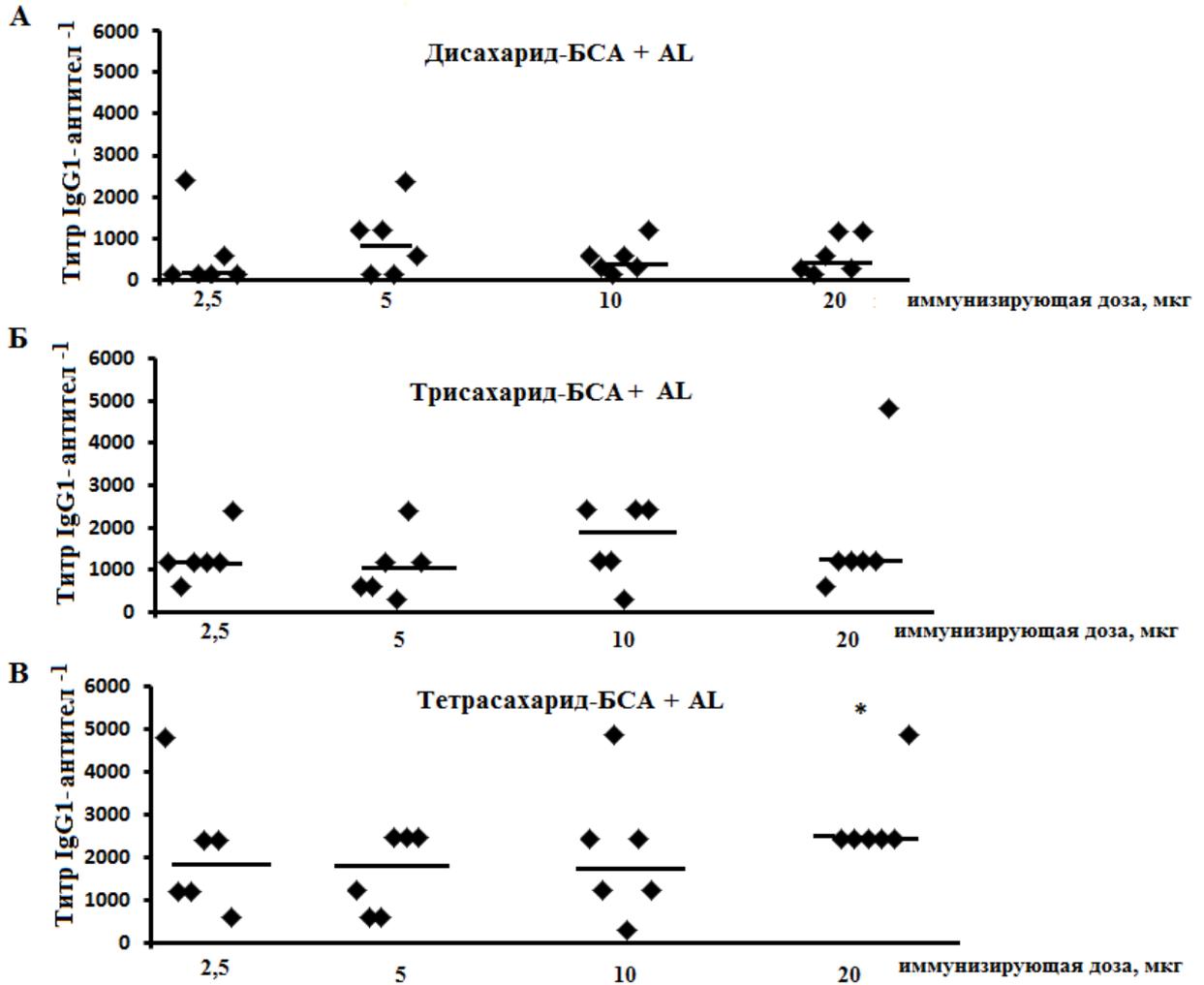
### **3.2. Изотипы антител углеводной специфичности, индуцированные к конъюгированным олигосахаридам**

Двукратную схему иммунизации мышей, успешно апробированную при использовании конъюгата дисахарид-БСА, адсорбированного на геле алюминия гидроксида, применили для сравнительной оценки иммунологической активности всех трех исследуемых гликоконъюгатов.

Мышей иммунизировали конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА двукратно с интервалом 14 суток в разовых дозах 2,5-5,0-10-20 мкг по углеводу на мыш. Сыворотки к гликоконъюгатам, полученные от каждой из 6 мышей, исследовали с помощью ИФА при использовании в качестве твердофазного антигена КП *S. pneumoniae* серотипа 3 для определения титра IgG1-АТ, специфичных к КП (**Рис.4**). Иммунизация конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, вызывала слабое образование АТ (**Рис.4А**). При иммунизации конъюгатом трисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, определяли более высокий уровень АТ (**Рис.4Б**). Конъюгат тетрасахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, в максимальной из испытанных иммунизирующих доз (20 мкг по углеводу на мыш), приводил к образованию самого высокого уровня IgG1-АТ специфичных к КП ( $P < 0,05$ ) (**Рис.4В**).

Конъюгаты ди-, три- и тетрасахарида с БСА без адьюванта не вызывали образование антител через 14 суток после 2-кратной иммунизации (данные не представлены).

Определение изотипов АТ к олигосахаридам в иммунных сыворотках животных проводили с помощью ИФА при использовании биотинилированных олигосахаридов, иммобилизованных на планшете, покрытом стрептавидиновом (**табл.4**).



**Рис.4.** Обратный титр IgG1-АТ, специфичных к КП, в сыворотках мышей, иммунизированных конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА, адсорбированными на геле алюминия гидроксида.

**Примечание.** Мышей иммунизировали двукратно внутрибрюшинно, адсорбированными на геле алюминия гидроксида конъюгатами БСА с ди- (**А**), три- (**Б**) и тетрасахаридом (**В**) в разовых дозах 2,5-5,0-10-20 мкг/мышь по углеводу с интервалом 14 суток. Через 2 недели после второй иммунизации исследовали сыворотку крови в каждой группе иммунизированных мышей (n=6). Титр IgG1-АТ определяли с помощью ИФА при использовании в качестве антигена, иммобилизованного на твердой фазе, бактериального КП *S. pneumoniae* серотипа 3. Горизонтальная линия, разделяющая группу точек – медиана. Тест Манна-Уитни. Достоверность различий между титром АТ, индуцированных дозой 20 мкг на мышь конъюгатом тетрасахарид-БСА с ди-, трисахарид-БСА, \*  $P < 0,05$ .

**Таблица 4.** Изотип и титр антител углеводной специфичности в сыворотке крови мышей, иммунизированных конъюгированными олигосахаридами при определении методом ИФА с помощью биотинилированных олигосахаридов, иммобилизованных на твердой фазе

Конъюгат олигосахарида, иммобилизованный на стрептавидиновом планшете	Исследуемая сыворотка	Изотип АТ/ титрАТ, $\log_{10}$				
		IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Дисахарид-биотин	дисахарид-БСА +AL	2,9±0,2*	3,4±0,2*	2,4±0,2*	2,0±0,1	<2
	КП-CRM <sub>197</sub> +AL	2,4±0,2*	< 2,0	< 2,0	< 2,0	<2
	контроль	2,0±0,1	< 2,0	< 2,0	< 2,0	<2
Трисахарид-биотин	трисахарид-БСА +AL	2,9±0,2*	3,4±0,2*	2,0±0,1	< 2,0	<2
	КП-CRM <sub>197</sub> +AL	2,4±0,2	< 2,0	2,0±0,1	< 2,0	<2
	контроль	2,3±0,2	< 2,0	< 2,0	< 2,0	<2
Тетрасахарид-биотин	тетрасахарид-БСА +AL	2,9±0,2*	3,9±0,2*	2,4±0,2*	2,9±0,2*	<2
	КП-CRM <sub>197</sub> +AL	2,9±0,2*	2,6±0,2*)**	2,3±0,2	2,0±0,1	<2
	контроль	2,3±0,2	< 2,0	< 2,0	< 2,0	<2

**Примечание.** Контроль - неиммунизированные мыши. AL – соль алюминия. Пуловые сыворотки получены от мышей (n=6), иммунизированных внутрибрюшинно двукратно гликоконъюгатами, адсорбированными на геле алюминия гидроксида (20 мкг/мышь по углеводу) и КП-CRM<sub>197</sub>, адсорбированным на геле алюминия фосфата, в разовой дозе 1,1 мкг по углеводу на 14 сутки после 2-ой иммунизации. Результаты представлены по данным 4-х измерений. M±SD. Тест Манна-Уитни. Достоверность различий: \* - с контролем; \*\* - между конъюгатами тетрасахарид-БСА+AL и КП-CRM<sub>197</sub>+AL при определении с помощью биотинилированного тетрасахарида,  $P < 0,05$ .

Во всех сыворотках к конъюгатам олигосахаридов с БСА обратный титр олигосахаридспецифических IgM-АТ составил  $\log_{10} 2,9$  ( $P < 0,05$ ) независимо от биотилированного олигосахарида, иммобилизованного на твердой фазе. В сыворотке к КП-CRM<sub>197</sub> при определении с помощью биотинилированных ди-, три- и тетрасахаридов, иммобилизованных на твердой фазе, титр АТ составил -  $\log_{10} 2,4; 2,4; 2,9$  соответственно; в контроле, у неиммунизированных мышей -  $\log_{10} 2,0-2,3$ .

Конъюгат тетрасахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, индуцировал образование у мышей самого высокого уровня сывороточных IgG1-АТ ( $\log_{10} 3,9$ ), специфичных к тетрасахариду ( $P < 0,05$ ); конъюгаты ди- и трисахарида, адсорбированные на геле алюминия гидроксида, вызывали образование АТ, специфичных к ди- и трисахариду в равном титре ( $\log_{10} 3,4$ ) ( $P < 0,05$ ). КП-CRM<sub>197</sub>, адсорбированный на геле алюминия фосфата (Превенар 13), индуцировал выработку IgG1-АТ в существенно меньшей степени, чем конъюгированный тетрасахарид, и титр IgG1-АТ, специфичных к КП выявляли только с помощью биотинилированного тетрасахарида ( $P < 0,05$ ).

IgG2a-АТ углеводной специфичности выявлены только при иммунизации конъюгированными ди- и тетрасахаридом в титре  $\log_{10} 2,4$  ( $P < 0,05$ ).

Наибольший уровень IgG2b-АТ определяли в сыворотке к тетрасахариду с помощью конъюгата тетрасахарид-биотин, иммобилизованного на стрептавидиновом планшете.

IgG3-АТ не выявлены ни в одном случае.

В контрольных группах титр АТ составлял  $\log_{10} < 2,0-2,3$ .

Таким образом, наибольшее разнообразие изотипов антител (IgG1, IgG2a, IgG2b) индуцировал конъюгат тетрасахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, а наибольшей диагностической значимостью обладал биотинилированный тетрасахарид.

Изотип и титр АТ в сыворотке крови мышей, иммунизированных гликоконъюгатами, при использовании КП *S. pneumoniae* серотипа 3 в качестве твердофазного антигена, представлены в **таблице 5**.

**Таблица 5.** Изотип и титр антител специфичных к КП в сыворотке крови мышей, иммунизированных гликоконъюгатами, при определении методом ИФА с помощью КП *S. pneumoniae* серотипа 3, иммобилизованного на твердой фазе

Антиген, иммобилизованный на твердой фазе	Исследуемая сыворотка	Изотип АТ / титр АТ log <sub>10</sub>				
		IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
КП <i>S. pneumoniae</i> серотипа 3	дисахарид-БСА+AL	3,2±0,2	< 2,0	< 2,0	< 2,0	<2,0
	трисахарид-БСА+AL	3,2±0,2	< 2,0	< 2,0	< 2,0	<2,0
	тетрасахарид-БСА+AL	3,2±0,2	3,2±0,2*)**	2,0±0,1	< 2,0	<2,0
	КП-CRM <sub>197</sub> +AL	3,2±0,2	2,6±0,2*	< 2,0	< 2,0	<2,0
	контроль	3,2±0,2	< 2,0	< 2,0	< 2,0	<2,0

**Примечание.** Контроль - неиммунизированные мыши. Сыворотки получены на 14 сутки после 2-ой иммунизации мышей (n=6 для каждого конъюгата). Конъюгат CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (1,1 мкг/мышь по углеводу, что соответствует 1/2 дозы, рекомендуемой для человека), адсорбированный на геле алюминия фосфата (Превенар 13). Результаты представлены по данным 4-х измерений. Тест Манна-Уитни. M±SD. Достоверность разницы \* - с контролем; \*\* - между тетрасахарид-БСА+AL и КП-CRM<sub>197</sub> AL, P < 0,05.

При использовании КП в качестве антигена в твердофазном ИФА, выявляли только IgG1-АТ, индуцированные конъюгатом тетрасахарид-БСА и КП-CRM<sub>197</sub>, причем их уровень был выше в сыворотке к конъюгату тетрасахарид-БСА (P < 0,05).

### 3.3. Агглютинирующая способность сывороток к гликоконъюгатам

Наибольшая способность антител к тетрасахариду, по сравнению с антителами к ди- и трисахариду, распознавать КП, иммобилизованный на твердой фазе, подтверждена в дополнительном тесте по изучению

агглютинации на стекле живых бактерий *S. pneumoniae* серотипа 3 антителами, содержащимися в иммунных сыворотках (**табл. 6**).

**Таблица 6.** Агглютинация на стекле живых бактерий *S. pneumoniae* серотипа 3 в присутствии иммунных сывороток

Сыворотка	Агглютинация
Дисахарид-БСА+AL	±
Трисахарид-БСА+AL	+++
Тетрасахарид-БСА+AL	++++
КП-CRM <sub>197</sub> +AL*	+++
К инактивированным бактериям <i>S.pneumoniae</i> серотипа 3	+++
Контроль (+) – стандартная сыворотка к КП <i>S.pneumoniae</i> серотипа 3	++++
Контроль (-) – нативная сыворотка	-

**Примечание.** Контроль (+) – коммерческая серотиповая пневмококковая антисыворотка на латексе (Statens Serum Institut, Дания); контроль (-) сыворотка неиммунизированных мышей; \* - входит в состав коммерческой конъюгированной 13-валентной пневмококковой вакцины Превенар 13.

Для постановки реакции агглютинации использовали сыворотки, полученные при иммунизации мышей конъюгатами ди-, три- и тетрасахаридов с БСА, адсорбированными на геле алюминия гидроксида. Положительным контролем служили коммерческие кроличьи серотиповые пневмококковые антисыворотки на латексе к *S. pneumoniae* серотипа 3, отрицательным контролем – сыворотка неиммунизированных мышей. Для сравнения использовали сыворотку к конъюгату КП-CRM<sub>197</sub> (Превенар 13), и антибактериальную сыворотку к *S. pneumoniae* 3.

Полученные данные подтвердили, что самой высокой агглютинирующей способностью (++++) обладала сыворотка к конъюгированному тетрасахариду, адсорбированному на геле алюминия гидроксида, которая по своей активности не отличалась от коммерческой серотиповой пневмококковой антисыворотки на латексе. Агглютинирующая

способность антимикробной кроличьей сыворотки к инактивированным микробным клеткам и к CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13) была меньше (+++).

### 3.4. Антитело-зависимый фагоцитоз (опсонофагоцитоз)

При исследовании способности нейтрофилов и моноцитов периферической крови интактных мышей захватывать инактивированные бактериальные клетки *S. pneumoniae* серотипа 3 в присутствии иммунных сывороток, получены сходные данные о наибольшей активности сыворотки к конъюгату тетрасахарида (*табл.7*).

**Таблица 7.** Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови интактных мышей в присутствии иммунной и нативной сывороток

№№	Пуловая сыворотка мышей	% захваченных инактивированных бактерий <i>S. pneumoniae</i> серотипа 3	
		Нейтрофилы	Моноциты
1	Без сыворотки (К-)	39,9±2,2	44,8±2,7
2	Нативная (К+)	50,9±2,6*	58,8±1,6*
3	Дисахарид-БСА+AL	64,9±2,2*)**	68,1±3,5*)**
4	Трисахарид-БСА+AL	71,4±1,6*)**	76,2±2,0*)**
5	Тетрасахарид-БСА+AL	78,1±1,9*)***)**	81,5±2,5*)***)**
6	КП-CRM <sub>197</sub> +AL	65,2±1,9*)**	60,8±2,9*

**Примечание.** AL – соль алюминия. К пуловой сыворотке периферической крови неиммунизированных мышей (n=10) прибавляли: инактивированные ацетоном FITC-меченые клетки *S.pneumoniae* серотипа 3 - отрицательный контроль (К-); FITC-меченые клетки с прибавлением нативной сыворотки – положительный контроль (К+); FITC-меченые клетки с прибавлением иммунной сыворотки к конъюгатам ди-, три-тетрасахаридов с БСА и CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13). Пуловую сыворотку получали на 14 день после двукратной иммунизации мышей (n=6 в каждой группе) гликоконъюгатами в разовой дозе 20 мкг по углеводу на мышь и CRM<sub>197</sub>-КП - 1,1 мкг/мышь по КП *S.pneumoniae* серотипа 3 (n=6). Результат оценивали методом проточной цитофлуориметрии в 4-х гейтах. M±SD. Тест Манна–Уитни. \* - достоверность различий с группой без прибавления сыворотки; \*\* - с прибавлением нативной сыворотки; \*\*\* - между сывороткой к конъюгату тетрасахарида-БСА+AL и сывороткой к CRM<sub>197</sub>-КП+AL, P < 0,05.

После обработки инактивированных бактериальных клеток *S. pneumoniae* серотипа 3 сыворотками, полученными к конъюгатам ди-, три- и тетрасахарида с БСА, процент захваченных бактерий нейтрофилами и моноцитами периферической крови мышей был выше, чем клеток, не обработанных сывороткой ( $P < 0,05$ ) и с прибавлением нативной сыворотки ( $P < 0,05$ ). Между сыворотками к конъюгатам ди-, три- и тетрасахарида с БСА существенных различий не выявлено. Следует отметить, что только сыворотка к конъюгированному тетрасахариду способствовала большему захвату инактивированных бактериальных клеток *S. pneumoniae* серотипа 3 нейтрофилами и моноцитами мышей по сравнению с сывороткой к CRM<sub>197</sub>-КП ( $P < 0,05$ ).

### **3.5. Протективная активность гликоконъюгатов**

Протективную активность гликоконъюгатов оценивали в опытах активной защиты мышей от заражения штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 (*табл.8*). Мышей иммунизировали двукратно внутрибрюшинно, адсорбированными на геле алюминия гидроксида конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА, разовыми дозами 2,5; 5,0; 10 или 20 мкг/мышь по углеводу. В качестве группы сравнения использовали мышей, иммунизированных адсорбированным на геле алюминия фосфата конъюгатом CRM<sub>197</sub> с КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13) в разовой дозе 1,1 мкг/мышь по углеводу. Контролем служили мыши, которым вводили 0,9% натрия хлорида по той же схеме. Мышей заражали внутрибрюшинно *S. pneumoniae* серотипа 3 дозой 5,6 LD<sub>50</sub> через 2 недели после второй иммунизации.

**Таблица 8.** Протективная активность конъюгатов ди-, три и тетрасахарида с БСА, адсорбированных на геле алюминия гидроксида, при заражении *S. pneumoniae* серотипа 3 дозой 5,6 LD<sub>50</sub>

Гликоконъюгат	Разовая иммунизирующая доза по углеводу, мкг	Титр IgG1-АТ к КП, log <sub>10</sub>	Число выживших мышей из числа взятых в опыт, дни наблюдения							
			1	2	3	6	16	Выжило/ всего	% выживших	ED <sub>50</sub> , мкг
Дисахарид-БСА+AL	2,5	2,5±0,5	8/8	8/8	8/8	7/8	7/8	7/8*	87,5	<2,5
	5,0	2,8±0,5	8/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
	10	2,7±0,3	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
	20	2,7±0,3	8/8	8/8	7/8	7/8	7/8	7/8*	87,5	
Трисахарид-БСА+AL	2,5	3,1±0,2	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	<2,5
	5,0	3,0±0,3	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
	10	3,2±0,4	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
	20	3,2±0,3	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
Тетрасахарид-БСА+AL	2,5	3,3±0,3	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	<2,5
	5,0	3,2±0,2	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
	10	3,2±0,4	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
	20	3,5±0,1*	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8**	100	
КП-CRM <sub>197</sub> + AL (Превенар 13)	1,1	2,6±0,3	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6**	100	<1,1
Контроль заражающей дозы (10 <sup>4</sup> м.к.), LD <sub>50</sub> = 1,8x10 <sup>3</sup> м.к.	10 <sup>3</sup>	0±0	8/8	7/8	5/8	5/8	5/8	5/8	62,5	-
	10 <sup>4</sup>	0±0	8/8	2/8	1/8	1/8	1/8	1/8	12,5	-
	10 <sup>5</sup>	0±0	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0	-

**Примечание.** Контроль - 0,9% NaCl. Мышей иммунизировали 2-кратно внутрибрюшинно. Титр IgG1-АТ определяли в ИФА на 14 сутки после 2-ой иммунизации. В качестве антигена, иммобилизованного на твердой фазе использовали КП *S.pneumoniae* серотипа 3. Через 2 недели после второй иммунизации мышей заражали *S.pneumoniae* типа 3. AL- соль алюминия; LD<sub>50</sub> – 50%-ная летальная доза; ED<sub>50</sub> – 50%-ная эффективная доза. Достоверность различий между опытом и контролем, точный критерий Фишера, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Самой высокой протективной активностью обладали конъюгаты три- и тетрасахарида с БСА, а также конъюгат КП-CRM<sub>197</sub> (Превенар 13). Независимо от иммунизирующей дозы в этих группах выжило 100% мышей. Единичная гибель мышей отмечена в группе животных, иммунизированных конъюгатом дисахарид-БСА. В контрольной группе мышей, получавших 0,9 %-ный раствор натрия хлорида, выжила 1 мышь из 8 зараженных. В ранее проведенных иммунологических исследованиях показано, что наибольшей антигенной и иммуногенной активностью характеризовался конъюгированный тетрасахарид, а наименьшей - конъюгированный дисахарид. При проведении настоящего исследования разницы в протективной активности между конъюгированными три- и тетрасахаридом выявить не удалось из-за невысокой заражающей дозы штамма, использованного для заражения мышей. Титр IgG1-АТ к КП в сыворотке крови мышей, иммунизированных конъюгированным тетрасахаридом в разовой дозе 20 мкг/мышь был самым высоким ( $P < 0,05$ ).

Таким образом, конъюгат тетрасахарида с БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, по сравнению с адсорбированными конъюгатами ди- и трисахаридов, после двукратной иммунизации мышей стимулирует образование более высокого уровня опсонизирующих антител, относящихся к иммуноглобулинам разных изотипов, и характеризуется высокой протективной активностью.

## ГЛАВА 4. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ И ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ НА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ НЕОГЛИКОКОНЬЮГАТАМИ

### 4.1. Содержание эндотоксина в гликоконъюгатах

Для проведения молекулярно-клеточных реакций необходимо было убедиться, что содержание эндотоксина (липополисахарид – ЛПС) в гликоконъюгатах не превышает допустимых значений, так как ЛПС является лигандом для TLR4-MD-2 и запускает каскад иммунных реакций (*табл. 9*).

**Таблица 9.** Содержание эндотоксина в конъюгированных олигосахаридах в ЛАЛ-тесте

Гликоконъюгат	ЕЭ/мл	Нг/мл
Дисахарид-БСА	0,08	0,008-0,016
Трисахарид-БСА	0,11	0,011-0,022
Тетрасахарид-БСА	0,09	0,009-0,018

**Примечание.** 1 ЕЭ соответствует 0,1-0,2 нг эндотоксина/мл [56].

Полученные данные свидетельствуют о незначительном содержании эндотоксина в исследованных гликоконъюгатах.

### 4.2. Цитокины *in vitro*

В исследовании *in vitro* определяли продукцию цитокинов под действием биотинилированных ди-, три- и тетрасахаридов мононуклеарными лейкоцитами селезенки интактных мышей. Для этого на планшете, покрытом стрептавидином, иммобилизовали конъюгаты ди-, три- и тетрасахарида с

биотином, прибавляли монокультуру спленоцитов мышей и инкубировали при 37° С в течение 24 ч. В контроле, спленоциты мышей вносили в лунки планшет без предварительной иммобилизации на их поверхности биотинилированных олигосахаридов. Концентрацию цитокинов определяли в супернатанте клеток методом проточной цитофлуориметрии.

Все исследованные биотинилированные олигосахариды индуцировали продукцию IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , кроме IL-6 и GM-CSF (*табл.10*). В контроле уровень цитокинов не повышался, за исключением незначительного увеличения концентрации TNF $\alpha$  (16,4 пг/мл). В опытной группе этот показатель не имел существенных различий при использовании конъюгатов ди-, три- и тетрасахарида с биотином (356-492 пг/мл). При использовании конъюгата тетрасахарид-биотин самой высокой была продукция IL-4 (17,1 пг/мл), IL-10 (49,7 пг/мл) и IFN $\gamma$  (18,9 пг/мл) по сравнению с конъюгатами ди- (12,8; 19,7; 12,0 пг/мл соответственно) и три- биотина (9,3; 16,3; 11,8 пг/мл соответственно) ( $P < 0,05$ ). Существенной разницы в продукции указанных цитокинов при использовании биотинилированных ди- и трисахаридов не выявлено. В этом исследовании подтвердилась самая высокая способность тетрасахарида, конъюгированного с биотином, индуцировать продукцию цитокинов.

**Таблица 10.** Продукция цитокинов мононуклеарными лейкоцитами селезенки интактных мышей, индуцированная биотинилированными олигосахаридами, иммобилизованными на твердой фазе

№№ группы	Биотинилированные олигосахариды, иммобилизованные на стрептавидиновой планшете	Цитокины, пкг/мл									
		IL-1 $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-17A	GM-CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
1	Дисахарид-биотин	26,1 $\pm$ 0,9*	18,4 $\pm$ 1,0*	12,8 $\pm$ 0,1*)	10,1 $\pm$ 0,4*	0	19,7 $\pm$ 3,0*	28,8 $\pm$ 1,8*	0	12,0 $\pm$ 0,2*	429 $\pm$ 73,8*
2	Трисахарид-биотин	24,7 $\pm$ 1,5*	18,2 $\pm$ 0,5*	9,3 $\pm$ 0,9*	11,1 $\pm$ 0,1	0	16,3 $\pm$ 3,3*	27,8 $\pm$ 0*	0	11,8 $\pm$ 0,6*	356,1 $\pm$ 230*
3	Тетрасахарид-биотин	24,7 $\pm$ 0,7*	18,1 $\pm$ 1,1*	17,1 $\pm$ 2,7*)**	12,7 $\pm$ 1,6*	0	49,7 $\pm$ 3,2*)**	28,9 $\pm$ 0,2*	0	18,9 $\pm$ 0,5*)**	492,6 $\pm$ 0,5*
4	Контроль (неиммунизированные мыши)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16,4 $\pm$ 0,14

**Примечание.** \* - Достоверность различий групп 1, 2, 3 с группой 4 (контроль), \*\* - между группами 1, 2 и 3. Результат оценивали методом проточной цитофлуориметрии при исследовании каждого образца в 4-х гейтах. M $\pm$ SD. Тест Манна-Уитни,  $P < 0,05$ .

### 4.3. Цитокины *ex vivo*

Конъюгат БСА с дисахаридом, соответствующим минимальной структурной единице КП *S. pneumoniae* серотипа 3, являлся оптимальным объектом для исследования молекулярно-клеточных показателей вследствие его самой низкой иммуногенной и протективной активности по сравнению конъюгатами три- и тетрасахарида с БСА, что позволяло оценить иммунный ответ у мышей при его введении без адъюванта и при использовании геля алюминия гидроксида для усиления иммунного ответа *in vivo*. В предварительных опытах, на примере конъюгата дисахарид-БСА, мы отработали схему иммунизации мышей и выбрали оптимальную иммунизирующую дозу (раздел 3.1). На основании этих данных для иммунизации мышей использовали конъюгат дисахарид с БСА в дозе 20 мкг/мышь по углеводу. Уровень цитокинов определяли в сыворотке крови мышей через 1 и 7 суток после 1-ой иммунизации и на 1 и 7 сутки после 2-ой иммунизации, которую проводили с интервалом 14 суток. В качестве контроля использовали сыворотку неиммунизированных мышей.

Конъюгат дисахарид-БСА без адъюванта индуцировал высокую продукцию цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ). IL-2 однократно повышался на 7 сутки после 1-ой иммунизации. Уровни IL-4 и IL-12p70 не имели различий с контролем (*табл.11*). IL-5 повышался через 7 суток после 2-ого введения препарата. Концентрация IL-10 возрастала после бустерной иммунизации, а уровень IL-22 повышался на 7 сутки после 1-ой и на 1 и 7 сутки после 2-ой иммунизации.

Адсорбция конъюгата дисахарид-БСА на геле алюминия гидроксида приводила к более высокой и стойкой продукции цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  во все сроки наблюдения по сравнению с конъюгатом без адъюванта ( $P < 0,05$ ).

Алюминия гидроксид (250 мкг на мышь) в те же сроки исследования не вызывал продукции цитокинов (данные не представлены).

**Таблица 11.** Концентрация цитокинов в сыворотке крови мышей после иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным и неадсорбированным на геле алюминия гидроксида

Цитокины, пг/мл	1-я иммунизация				2-я иммунизация				Конт- роль (до им- муни- за- ции)
	1 день		7 день		1 день		7 день		
	дисахарид- БСА	дисахарид- БСА+AL	дисахарид- БСА	дисахарид- БСА+AL	дисахарид- БСА	дисахарид- БСА+AL	дисахарид- БСА	дисахарид- БСА+AL	
IL-1 $\alpha$	11,5 $\pm$ 1,2*	23,9 $\pm$ 2,4 <sup>*)**</sup>	13,1 $\pm$ 1,7*	24,0 $\pm$ 1,3 <sup>*)**</sup>	14,2 $\pm$ 3,7*	24,0 $\pm$ 3,1 <sup>*)**</sup>	12,9 $\pm$ 1,5*	25,7 $\pm$ 2,9 <sup>*)**</sup>	8,4 $\pm$ 1,9
IL-1 $\beta$	10,6 $\pm$ 1,3*	9,0 $\pm$ 1,4*	14,7 $\pm$ 0,9*	25,6 $\pm$ 1,4 <sup>*)**</sup>	11,2 $\pm$ 2,1*	16,9 $\pm$ 1,7 <sup>*)**</sup>	15,1 $\pm$ 1,0*	28,2 $\pm$ 1,1 <sup>*)**</sup>	2,4 $\pm$ 0,6
IL-2	0	0	1,4 $\pm$ 0,9*	1,8 $\pm$ 1,0*	0	0	0	0	0
IL-4	1,5 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,5 <sup>*)**</sup>	3,1 $\pm$ 0,8	8,9 $\pm$ 0,6 <sup>*)**</sup>	4,3 $\pm$ 1,0	6,9 $\pm$ 0,4*	4,6 $\pm$ 0,6	8,4 $\pm$ 0,5 <sup>*)**</sup>	4,9 $\pm$ 0,2
IL-5	5,9 $\pm$ 0,8	17,9 $\pm$ 2,2 <sup>*)**</sup>	6,2 $\pm$ 1,1	16,7 $\pm$ 3,0 <sup>*)**</sup>	6,9 $\pm$ 1,5	19,7 $\pm$ 3,0 <sup>*)**</sup>	8,9 $\pm$ 1,4*	21,3 $\pm$ 4,1 <sup>*)**</sup>	4,3 $\pm$ 1,2
IL-6	18,4 $\pm$ 2,0*	24,5 $\pm$ 1,5 <sup>*)**</sup>	9,7 $\pm$ 1,9*	18,5 $\pm$ 2,7 <sup>*)**</sup>	16,8 $\pm$ 1,5*	25,6 $\pm$ 2,7 <sup>*)**</sup>	15,5 $\pm$ 2,9*	24,9 $\pm$ 2,5 <sup>*)**</sup>	3,7 $\pm$ 0,6
IL-10	9,9 $\pm$ 1,2	14,2 $\pm$ 1,7 <sup>*)**</sup>	8,3 $\pm$ 1,9	18,8 $\pm$ 1,5 <sup>*)**</sup>	15,5 $\pm$ 2,3*	18,4 $\pm$ 0,6*	11,2 $\pm$ 1,7*	18,9 $\pm$ 0,7 <sup>*)**</sup>	6,7 $\pm$ 1,1
IL-12p70	7,2 $\pm$ 1,2	0	6,5 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 1,9	6,4 $\pm$ 0,4	0	5,9 $\pm$ 1,3	0	6,4 $\pm$ 0,8
IL-13	11,7 $\pm$ 3,5*	22,9 $\pm$ 1,2 <sup>*)**</sup>	16,1 $\pm$ 0,6*	24,8 $\pm$ 1,8 <sup>*)**</sup>	17,9 $\pm$ 1,4*	26,4 $\pm$ 2,5 <sup>*)**</sup>	23,8 $\pm$ 1,2*	15,3 $\pm$ 1,6 <sup>*)**</sup>	3,7 $\pm$ 0,7
IL-17A	308,3 $\pm$ 13,1*	1767 $\pm$ 91 <sup>*)**</sup>	257 $\pm$ 16,0*	1356 $\pm$ 55 <sup>*)**</sup>	222 $\pm$ 11,1*	1336 $\pm$ 70 <sup>*)**</sup>	28,9 $\pm$ 3,1*	1347 $\pm$ 22 <sup>*)**</sup>	19,3 $\pm$ 3
IL-21	12,8 $\pm$ 1,9*	23,0 $\pm$ 1,9 <sup>*)**</sup>	13,8 $\pm$ 2,0*	24,8 $\pm$ 1,5 <sup>*)**</sup>	11,6 $\pm$ 1,4*	22,2 $\pm$ 3,5 <sup>*)**</sup>	13,3 $\pm$ 2,0*	25,9 $\pm$ 1,3 <sup>*)**</sup>	0
IL-22	4,5 $\pm$ 1,4	5,9 $\pm$ 1,7	8,3 $\pm$ 1,1*	12,7 $\pm$ 2,0 <sup>*)**</sup>	9,2 $\pm$ 1,4*	12,2 $\pm$ 1,6 <sup>*)**</sup>	7,7 $\pm$ 1,3*	12,4 $\pm$ 0,8 <sup>*)**</sup>	4,6 $\pm$ 1,4
IFN $\gamma$	5,7 $\pm$ 0,6*	15,2 $\pm$ 2,2 <sup>*)**</sup>	7,5 $\pm$ 3,0*	28,7 $\pm$ 2,5 <sup>*)**</sup>	8,4 $\pm$ 0,4*	25,9 $\pm$ 1,9 <sup>*)**</sup>	12,8 $\pm$ 2,2*	28,8 $\pm$ 3,1 <sup>*)**</sup>	1,6 $\pm$ 0,1
TNF $\alpha$	21,9 $\pm$ 2,7*	31,9 $\pm$ 2,2 <sup>*)**</sup>	20,3 $\pm$ 1,9*	31,8 $\pm$ 2,1 <sup>*)**</sup>	24,1 $\pm$ 2,7*	36,3 $\pm$ 3,0 <sup>*)**</sup>	26,2 $\pm$ 1,8*	34,0 $\pm$ 2,3 <sup>*)**</sup>	4,5 $\pm$ 0,9

**Примечание.** AL – алюминия гидроксид. Проточная цитофлуориметрия. Пуловую сыворотку мышей (n=3) исследовали в 4-х гейтах. M $\pm$ SD. Тест Манна-Уитни. Достоверность различий: \* - с контролем; \*\* - между дисахарид-БСА и дисахарид-БСА+AL, P < 0,05.

Далее, интересно было более подробно выяснить динамику продукции всех исследованных цитокинов, индуцированных конъюгатом без адьюванта и адсорбированным на геле алюминия гидроксида, в зависимости от кратности иммунизации и срока наблюдения (*табл.12*).

**Таблица 12.** Уровень цитокинов в сыворотке крови мышей на 1 и 7 сутки после 1-ой и 2-ой иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА без адьюванта

Цитокины, пг/мл	Дисахарид-БСА				Контроль
	1-ая иммунизация		2-ая иммунизация		
	1 сутки	7 сутки	1 сутки	7 сутки	
IL-1 $\alpha$	11,5 $\pm$ 1,2 $\uparrow$	13,1 $\pm$ 1,7 $\uparrow$	14,2 $\pm$ 3,7 $\uparrow$	12,9 $\pm$ 1,5 $\uparrow$	8,4 $\pm$ 1,9
IL-1 $\beta$	10,6 $\pm$ 1,3 $\uparrow$	25,6 $\pm$ 1,4 $\uparrow^*$	11,2 $\pm$ 2,1 $\uparrow$	15,1 $\pm$ 1,0 $\uparrow$	2,4 $\pm$ 0,6
IL-2	<u>0</u>	1,4 $\pm$ 0,9 $\uparrow^*$	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
IL-4	<u>1,5<math>\pm</math>0,2</u>	<u>3,1<math>\pm</math>0,8</u>	<u>4,3<math>\pm</math>1,0</u>	<u>4,6<math>\pm</math>0,6</u>	4,9 $\pm$ 0,2
IL-5	<u>5,9<math>\pm</math>0,8</u>	<u>6,2<math>\pm</math>1,1</u>	<u>6,9<math>\pm</math>1,5</u>	8,9 $\pm$ 1,4 $\uparrow$	4,3 $\pm$ 1,2
IL-6	18,4 $\pm$ 2,0 $\uparrow$	9,7 $\pm$ 1,9 $\uparrow^*$	16,8 $\pm$ 1,5 $\uparrow$	15,5 $\pm$ 2,9 $\uparrow$	3,7 $\pm$ 0,6
IL-10	<u>9,9<math>\pm</math>1,2</u>	<u>8,3<math>\pm</math>1,9</u>	15,5 $\pm$ 2,3 $\uparrow$	11,2 $\pm$ 1,7 $\uparrow^*$	6,7 $\pm$ 1,1
IL-12p70	<u>7,2<math>\pm</math>1,2</u>	<u>6,5<math>\pm</math>0,9</u>	<u>6,4<math>\pm</math>0,4</u>	<u>5,9<math>\pm</math>1,3</u>	6,4 $\pm$ 0,8
IL-13	11,7 $\pm$ 3,5 $\uparrow$	16,1 $\pm$ 0,6 $\uparrow^*$	17,9 $\pm$ 1,4 $\uparrow$	23,8 $\pm$ 1,2 $\uparrow^*$	3,7 $\pm$ 0,7
IL-17A	308,3 $\pm$ 13,1 $\uparrow$	257 $\pm$ 16,0 $\uparrow^*$	222 $\pm$ 11,1 $\uparrow$	28,9 $\pm$ 3,1 $\uparrow^*$	19,3 $\pm$ 3,0
IL-21	12,8 $\pm$ 1,9 $\uparrow$	13,8 $\pm$ 2,0 $\uparrow$	11,6 $\pm$ 1,4 $\uparrow$	13,3 $\pm$ 2,0 $\uparrow$	0
IL-22	<u>4,5<math>\pm</math>1,4</u>	8,3 $\pm$ 1,1 $\uparrow^*$	9,2 $\pm$ 1,4 $\uparrow$	7,7 $\pm$ 1,3 $\uparrow$	4,6 $\pm$ 1,4
IFN $\gamma$	5,7 $\pm$ 0,6 $\uparrow$	7,5 $\pm$ 3,0 $\uparrow$	8,4 $\pm$ 0,4 $\uparrow$	12,8 $\pm$ 2,2 $\uparrow^*$	1,6 $\pm$ 0,1
TNF $\alpha$	21,9 $\pm$ 2,7 $\uparrow$	20,3 $\pm$ 1,9 $\uparrow$	24,1 $\pm$ 2,7 $\uparrow$	26,2 $\pm$ 1,8 $\uparrow$	4,5 $\pm$ 0,9

**Примечание.** Контроль – до иммунизации.  $\uparrow$  - повышение показателя по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ); Подчеркнуты значения, не имеющие различия с контролем. М $\pm$ SD.

Тест Манна-Уитни. Достоверность различий показателей между 1 и 7 сутками после 1-ой и 2-ой иммунизации соответственно, \*  $P < 0,05$ .

Определение уровня цитокинов в сыворотке крови мышей на 1 и 7 сутки после 1-ой и 2-ой иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА без адьюванта выявило статистически значимые различия, характеризующие динамику их изменения в процессе наблюдения.

Определено пять вариантов развития событий:

- 1) стабильное повышение: IL-1 $\alpha$  (11,5 $\uparrow$ ; 13,1 $\uparrow$  и 14,2 $\uparrow$ ; 12,9 $\uparrow$  соответственно vs 8,4 в контроле) пг/мл; IL-1 $\beta$  (10,6 $\uparrow$ ; 25,6 $\uparrow^*$  и 11,2 $\uparrow$ ; 15,1 $\uparrow$  соответственно vs 2,4 в контроле) пг/мл; IL-6 (18,4 $\uparrow$ ; 9,7 $\uparrow^*$  и 16,8 $\uparrow$ ; 15,5 $\uparrow$  соответственно, vs 3,7 в контроле) пг/мл; IL-13 (11,7 $\uparrow$ ; 16,1 $\uparrow^*$  и 17,9 $\uparrow$ ; 23,8 $\uparrow^*$  соответственно, vs 3,7 в контроле) пг/мл; IL-21 (12,8 $\uparrow$ ; 13,8 $\uparrow$  и 11,6 $\uparrow$ ; 13,3 $\uparrow$  соответственно vs 0 в контроле) пг/мл; IL-22 (4,5; 8,3 $\uparrow^*$  и 9,2 $\uparrow$ ; 7,7 $\uparrow$  соответственно, vs 4,6 в контроле) пг/мл; IFN $\gamma$  (5,7 $\uparrow$ ; 7,5 $\uparrow$  и 8,4 $\uparrow$ ; 12,8 $\uparrow^*$  соответственно, vs 1,6 в контроле) пг/мл; TNF $\alpha$  (21,9 $\uparrow$ ; 20,3 $\uparrow$  и 24,1 $\uparrow$ ; 26,2 $\uparrow$  соответственно, vs 4,5 в контроле) пг/мл;
- 2) повышение на после 2-ой иммунизации: IL-5 (5,9; 6,2 и 6,9; 8,9 $\uparrow$  соответственно, vs 4,3 в контроле) пг/мл; IL-10 ( 9,9; 8,3 и 15,5 $\uparrow$ ; 11,2 $\uparrow^*$  соответственно, vs 6,7 в контроле) пг/мл;
- 3) прогрессивное снижение: IL-17A (308,3 $\uparrow$ ; 257 $\uparrow^*$  и 222 $\uparrow$ ; 28,9 $\uparrow^*$  соответственно, vs 19,3 в контроле) пг/мл;
- 4) транзиторное повышение: IL-2 (0; 1,4 $\uparrow$  и 0; 0 соответственно vs 0 в контроле) пг/мл;
- 5) отсутствие изменений: IL-4 (1,5; 3,1 и 4,3; 4,6 соответственно, vs 4,9 в контроле) пг/мл; IL-12p70 (7,2; 6,5 и 6,4; 5,9 соответственно vs 6,4 в контроле) пг/мл.

По такой же схеме проведен анализ результатов, полученных при иммунизации мышей конъюгатом дисахарида с БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида (*табл.13*).

**Таблица 13.** Уровень цитокинов в сыворотке крови мышей на 1 и 7 сутки после 1-ой и 2-ой иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида

Цитокины, пг/мл	Дисахарид-БСА+AL				Контроль
	1-ая иммунизация		2-ая иммунизация		
	1 сутки	7 сутки	1 сутки	7 сутки	
IL-1 $\alpha$	23,9 $\pm$ 2,4 $\uparrow$	24,0 $\pm$ 1,3 $\uparrow$	24,0 $\pm$ 3,1 $\uparrow$	25,7 $\pm$ 2,9 $\uparrow$	8,4 $\pm$ 1,9
IL-1 $\beta$	9,0 $\pm$ 1,4 $\uparrow$	25,6 $\pm$ 1,4 $\uparrow$ *	16,9 $\pm$ 1,7 $\uparrow$	28,2 $\pm$ 1,1 $\uparrow$ *	2,4 $\pm$ 0,6
IL-2	<u>0</u>	1,8 $\pm$ 1,0 $\uparrow$	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
IL-4	7,9 $\pm$ 0,5 $\uparrow$	8,9 $\pm$ 0,6 $\uparrow$	6,9 $\pm$ 0,4 $\uparrow$	8,4 $\pm$ 0,5 $\uparrow$	4,9 $\pm$ 0,2
IL-5	17,9 $\pm$ 2,2 $\uparrow$	16,7 $\pm$ 3,0 $\uparrow$	19,7 $\pm$ 3,0 $\uparrow$	21,3 $\pm$ 4,1 $\uparrow$	4,3 $\pm$ 1,2
IL-6	24,5 $\pm$ 1,5 $\uparrow$	18,5 $\pm$ 2,7 $\uparrow$ *	25,6 $\pm$ 2,7 $\uparrow$	24,9 $\pm$ 2,5 $\uparrow$	3,7 $\pm$ 0,6
IL-10	14,2 $\pm$ 1,7 $\uparrow$	18,8 $\pm$ 1,5 $\uparrow$ *	18,4 $\pm$ 0,6 $\uparrow$	18,9 $\pm$ 0,7 $\uparrow$	6,7 $\pm$ 1,1
IL-12p70	<u>0</u>	<u>1,1<math>\pm</math>1,9</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	6,4 $\pm$ 0,8
IL-13	22,9 $\pm$ 1,2 $\uparrow$	24,8 $\pm$ 1,8 $\uparrow$	26,4 $\pm$ 2,5 $\uparrow$	23,8 $\pm$ 1,2 $\uparrow$	3,7 $\pm$ 0,7
IL-17A	1767 $\pm$ 91 $\uparrow$	1356 $\pm$ 55 $\uparrow$ *	1336 $\pm$ 70 $\uparrow$	1347 $\pm$ 22 $\uparrow$	19,3 $\pm$ 3,0
IL-21	23,0 $\pm$ 1,9 $\uparrow$	24,8 $\pm$ 1,5 $\uparrow$	22,2 $\pm$ 3,5 $\uparrow$	25,9 $\pm$ 1,3 $\uparrow$	0
IL-22	<u>5,9<math>\pm</math>1,7</u>	12,7 $\pm$ 2,0 $\uparrow$ *	12,2 $\pm$ 1,6 $\uparrow$	12,4 $\pm$ 0,8 $\uparrow$	4,6 $\pm$ 1,4
IFN $\gamma$	15,2 $\pm$ 2,2 $\uparrow$	28,7 $\pm$ 5,5 $\uparrow$ *	25,9 $\pm$ 1,9 $\uparrow$	28,8 $\pm$ 3,1 $\uparrow$	1,6 $\pm$ 0,1
TNF $\alpha$	31,9 $\pm$ 2,2 $\uparrow$	31,8 $\pm$ 2,1 $\uparrow$	36,3 $\pm$ 3,0 $\uparrow$	34,0 $\pm$ 2,3 $\uparrow$	4,5 $\pm$ 0,9

**Примечание.** Контроль – до иммунизации.  $\uparrow$  - повышение показателя по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ); Подчеркнуты значения, не имеющие различий с контролем. M $\pm$ SD.

Тест Манна-Уитни. Достоверность различий показателей между 1 и 7 сутками после 1-ой и 2-й иммунизации соответственно, \*  $P < 0,05$ .

В этом случае выявлено три варианта развития событий, то есть изменение уровня цитокинов происходило более стабильно при иммунизации конъюгатом в присутствии адьюванта:

- 1) стабильное повышение: IL-1 $\alpha$  (23,9 $\uparrow$ ; 24,0 $\uparrow$  и 24,0 $\uparrow$ ; 25,7 $\pm$ 2,9 $\uparrow$  соответственно vs 8,4 в контроле) пг/мл; IL-1 $\beta$  (9,0 $\uparrow$ ; 25,6 $\uparrow^*$  и 16,9 $\uparrow$ ; 28,2 $\uparrow^*$  соответственно, vs 2,4 в контроле); IL-4 (7,9 $\uparrow$ ; 8,9 $\uparrow$  и 6,9 $\uparrow$ ; 8,4 $\uparrow$  соответственно, vs 4,9 в контроле) пг/мл; IL-5 (17,9 $\uparrow$ ; 16,7 $\uparrow$  и 19,7 $\uparrow$ ; 21,3 $\uparrow$  соответственно vs 4,3 в контроле) пг/мл; IL-6 (24,5 $\uparrow$ ; 18,5 $\uparrow^*$  и 25,6 $\uparrow$ ; 24,9 $\uparrow$  соответственно, vs 3,7 в контроле) пг/мл; IL-10 (14,2 $\uparrow$ ; 18,8 $\uparrow^*$  и 18,4 $\uparrow$ ; 18,9 $\uparrow$  соответственно, vs 6,7 в контроле) пг/мл; IL-13 (22,9 $\uparrow$ ; 24,8 $\uparrow$  и 23,8 $\uparrow$ ; 23,8 $\uparrow$  соответственно, vs 3,7 в контроле) пг/мл; IL-17A (1767 $\uparrow$ ; 1356 $\uparrow^*$  и 1336 $\uparrow$ ; 1347 $\uparrow$  соответственно, vs 19,3 в контроле) пг/мл; IL-21 (23,0 $\uparrow$ ; 24,8 $\uparrow$  и 22,2 $\uparrow$ ; 25,9 $\uparrow$  соответственно vs 0 в контроле) пг/мл; IL-22 (5,9; 12,7 $\uparrow^*$  и 12,2 $\uparrow$ ; 12,4 $\uparrow$  соответственно, vs 4,6 в контроле) пг/мл; IFN $\gamma$  (15,2 $\uparrow$ ; 28,7 $\uparrow^*$  и 25,9 $\uparrow$ ; 28,8 $\uparrow$  соответственно, vs 1,6 в контроле) пг/мл; TNF $\alpha$  (31,9 $\uparrow$ ; 31,8 $\uparrow$  и 36,3 $\uparrow$ ; 34,0 $\uparrow$  соответственно, vs 4,5 в контроле) пг/мл;
- 2) транзиторное повышение: IL-2 (0; 1,8 $\uparrow$  и 0; 0 соответственно, 0 в контроле) пг/мл;
- 3) отсутствие изменений: IL-12p70 (0; 1,1 и 0; 0 соответственно, vs 6,4 в контроле) пг/мл.

Обобщенные данные, характеризующие действие конъюгата дисахарид-БСА, неадсорбированного и адсорбированного на геле алюминия гидроксида, представлены в *таблице 14*.

Спектр и уровень цитокинов был выше при иммунизации мышей конъюгатом, адсорбированным на геле алюминия гидроксида (12 цитокинов) по сравнению с конъюгатом без адъюванта (8 цитокинов).

**Таблица 14.** Влияние алюминия гидроксида на продукцию цитокинов, индуцированную конъюгатом дисахарид-БСА

№№	Изменение показателя	Дисахарид-БСА	Дисахарид-БСА+AL
1	Стабильное повышение	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13, IL-21, IL-22; IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$	IL-1 $\alpha$ ↑, IL-1 $\beta$ ↑, IL-4↑, IL-5↑, IL-6↑, IL-10↑, IL-13↑, 17A↑, IL-21↑, IL-22↑, IFN $\gamma$ ↑, TNF $\alpha$ ↑
2	Повышение после 2-ой иммунизации	IL-5; IL-10	-
3	Прогрессивное снижение	IL-17A	-
4	Транзиторное повышение	IL-2	IL-2
5	Отсутствие изменений	IL-4, IL-12p70	IL-12p70

**Примечание.** ↑ - повышение по сравнению с конъюгатом дисахарид-БСА без адъюванта,  $P < 0,05$ .

Особого внимания заслуживает IL-17A. Выявлены контрастные различия в зависимости от присутствия алюминия гидроксида. Конъюгат без адъюванта индуцировал высокий уровень IL-17A через 1 сутки после 1-ой иммунизации (308,3 пг/мл), что в 15 раз превышало контрольное значение; к 7 суткам (257 пг/мл), то есть в 13 раз выше, чем в контроле, затем продолжал снижаться на 1 и 7 сутки после бустерной иммунизации (222 и 28,9 пг/мл соответственно), что было в 11 и 1,5 раз выше, чем в контроле). Напротив, в присутствии алюминия гидроксида через 1 сутки после 1-ой иммунизации концентрация IL-17A составляла 1767 пг/мл, к 7 суткам 1356 пг/мл, что было в 91 и 70 раз выше контрольных показателей. Бустерная иммунизация не влияла на концентрацию IL-17A, которая оставалась на высоком уровне на 1 и 7 сутки (1336 и 1347

пг/мл), то есть в 69 и 70 раз выше, чем в контроле. Не умаляя роли Th1- и Th2-цитокинов, которые повышались после иммунизации, не исключено, что IL-17A играет ключевую роль в иммунном ответе на конъюгат дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида.

#### **4.4. Экспрессия поверхностных молекул на мононуклеарных лейкоцитах селезенки мышей**

Экспрессию поверхностных молекул в культуре спленоцитов мышей определяли в те же сроки, что и цитокины - до иммунизации (контроль) и на 1 и 7 сутки после 1-ой и 2-ой иммунизации неадсорбированным и адсорбированным на геле алюминия гидроксида конъюгатом дисахарид-БСА (разовая доза 20 мкг/мышь по углеводу) (*табл.15*).

Уровень экспрессии молекул CD3<sup>+</sup> Т-клеток под действием конъюгата дисахарид-БСА, адсорбированного на геле алюминия гидроксида, повышался на 1 сутки после 1-ой иммунизации и был выше по сравнению с контролем и конъюгатом дисахарид-БСА без адъюванта ( $P < 0,05$ ), а к 7 суткам снижался до контрольных значений и не повышался после бустерной иммунизации. Конъюгат дисахарид-БСА без адъюванта вызывал более позднее повышение экспрессии молекул CD3<sup>+</sup> Т-клеток - на 7 сутки после 1-ой иммунизации ( $P < 0,05$ ), уровень которых не повышался после бустерной иммунизации.

Повышение экспрессии молекул CD4<sup>+</sup> Т-хелперов отмечали на 1 и 7 сутки после 1-ой иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА без адъюванта по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ), а после иммунизации конъюгатом, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, только через 1 сутки ( $P < 0,05$ ). Бустерная иммунизация не приводила к повышению экспрессии молекул CD4<sup>+</sup> Т-хелперов независимо от срока исследования и присутствия адъюванта.

Уровень поверхностных молекул CD8<sup>+</sup> Т-цитотоксических клеток повышался только при иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, на 7 сутки после первой иммунизации и на 1 сутки после бустерного введения ( $P < 0,05$ ).

**Таблица 15.** Уровень поверхностных молекул на спленоцитах мышей после иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА

Поверхностные молекулы спленоцитов, %	1-я иммунизация				2-я иммунизация				Конт-роль
	1 сутки		7 суток		1 сутки		7 суток		
	дисахарид-БСА	дисахарид-БСА+AL	дисахарид-БСА	дисахарид-БСА+AL	дисахарид-БСА	дисахарид-БСА+AL	дисахарид-БСА	дисахарид-БСА+AL	
CD3 <sup>+</sup>	60,8± 3,5	65,2± 1,4*)**	64,3± 1,5*	60,4± 1,9	61,4± 3,0	60,1± 3,1	54,8± 1,7	58,8± 2,9	57,2± 1,9
CD4 <sup>+</sup>	39,3± 2,1*	42,2± 1,4*	37,5± 2,4*)**	28,5± 2,1	29,4± 2,2	24,1± 2,3	27,1± 0,1	28,1± 2,1	25,2± 2,2
CD8 <sup>+</sup>	23,4± 1,0	24,1± 1,0	23,1± 2,1	30,8± 1,9*)**	21,6± 2,2	27,0± 1,7*)**	25,1± 2,0	26,6± 3,4	22,1± 0,5
TCR <sup>+</sup> (γδT)	5,1± 0,3*	6,0± 0,2*	0,5± 0,1	0,4± 0,1	2,5± 0,4*	5,8± 0,6*)**	1,8± 0,3*	19,0± 2,1*)**	0,6± 0,1
CD19 <sup>+</sup>	18,8± 1,2	20,6± 1,4	18,7± 2,1	23,4± 3,3	23,7± 3,0	25,9± 2,1*	24,2± 2,0	26,1± 1,9*	22,0± 2,1
CD5 <sup>+</sup>	4,7± 0,2*	4,1± 0,3*	2,5± 0,5	2,1± 0,2	4,1± 0,8*	4,5± 0,4*	7,8± 0,5*	13,0± 1,7*)**	2,6± 0,2
CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup>	32,5± 1,4*)**	28,0± 1,1*	14,4± 2,2	27,3± 2,2*)**	34,1± 2,1*	32,2± 2,2*	26,1± 2,9*)**	18,6± 2,3	15,4± 1,1
CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup>	16,8± 2,9*)**	8,3± 1,2*	6,4± 0,6*	17,5± 2,3*)**	6,4± 0,7*	18,4± 2,3*)**	4,3± 0,3	5,7± 0,4*	3,2± 0,3
CD25 <sup>+</sup>	4,1± 0,5	11,5± 1,1*)**	12,9± 1,8*	13,7± 2,6*	20,4± 1,8*	19,8± 1,7*	5,8± 0,4	8,2± 1,4	6,4± 1,1
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /Foxp3	1,9± 0,4*	1,1± 0,5*	2,0± 0,5*	3,0± 0,5*	3,1± 0,3*	2,4± 0,3*	0,5± 0,3	2,6± 0,2*)**	0,4± 0,2
MHCII <sup>+</sup>	22,6± 1,9	22,1± 1,0	17,4± 2,4	17,2± 1,7	34,7± 2,5*	30,2± 1,9*	34,1± 1,9*	57,2± 3,2*)**	17,4± 2,1

**Примечание.** Контроль - до иммунизации. AL – алюминия гидроксид. Проточная цитофлуориметрия в 4-х гейтах для каждого образца. M±SD. Тест Манна-Уитни. Достоверность различий: \* - с контролем; \*\* - между дисахарид-БСА и дисахарид-БСА+AL, P < 0,05.

Уровень экспрессии TCR<sup>+</sup> γδ Т-клеток при иммунизации конъюгатом БСА с дисахаридом без адьюванта повышался через 1 сутки после первой и на 1 и 7 сутки после второй иммунизации по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ). Конъюгат, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, после первой иммунизации вызывал такую же экспрессию поверхностных молекул TCR<sup>+</sup> γδ Т-клеток, как конъюгат без адьюванта. После бустерной иммунизации конъюгатом, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, отмечали повышение экспрессии TCR<sup>+</sup> γδ Т-клеток с 1 по 7 сутки (с 5,8% до 19% при 0,6% в контроле), по сравнению с конъюгатом без адьюванта (с 2,5% и 1,8% при 0,6% в контроле).

После введения конъюгата дисахарид-БСА экспрессия поверхностных молекул CD19<sup>+</sup> В-клеток оставалась на исходном уровне во все сроки исследования, но повышалась в оба срока наблюдения после бустерной иммунизации конъюгатом, адсорбированным на геле алюминия гидроксида.

Экспрессия молекул CD5<sup>+</sup> В1-клеток повышалась после иммунизации конъюгатом неадсорбированным и адсорбированным на геле алюминия гидроксида, по сравнению с контролем через 1 сутки после первой иммунизации ( $P < 0,05$ ) и в оба срока наблюдения после бустерной иммунизации ( $P < 0,05$ ). Следует отметить, что на 7 сутки после 2-ой иммунизации экспрессия поверхностных молекул под действием конъюгата с адьювантом превышала уровень экспрессии CD5<sup>+</sup>, под действием конъюгата дисахарид-БСА без адьюванта (13,0 против 7,8)% ( $P < 0,05$ ).

Уровень молекул CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> НК-клеток повышался через сутки после 1-ого введения конъюгата дисахарид-БСА без адьюванта, затем снижался до контрольных значений. После бустерной иммунизации экспрессия поверхностных молекул оставалась высокой во все сроки наблюдения по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ). Адсорбция конъюгата на геле алюминия гидроксида повышала содержание молекул CD16<sup>+</sup>/32 на 1 сутки после первой и второй иммунизации по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ).

Содержание поверхностных молекул CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> NKT-клеток повышалось под действием неадсорбированного и адсорбированного конъюгата дисахарид-БСА в оба срока после первой иммунизации и на 1 сутки после бустерного введения конъюгатов ( $P < 0,05$ ). Наибольшая экспрессия молекул CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> NKT-клеток по сравнению с конъюгатом без адъюванта отмечена на 7 сутки после 1-ой иммунизации и на 1 сутки после бустерного введения ( $P < 0,05$ ).

Уровень молекулы активации CD25<sup>+</sup> - рецептора к интерлейкину 2, при иммунизации конъюгатом без адъюванта повышался на 7 сутки после 1-ой иммунизации и на 1 сутки после 2-ой иммунизации по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ). При иммунизации адсорбированным конъюгатом экспрессия поверхностных молекул CD25<sup>+</sup> была выше по сравнению с конъюгатом без адъюванта на 1 сутки после первой и второй иммунизации ( $P < 0,05$ ).

Экспрессия молекул CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3 T-регуляторных клеток (T-regulatory cells - Treg) повышалась по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ) независимо от присутствия адъюванта. На 7 сутки после бустерного введения конъюгата с адъювантом уровень экспрессии поверхностных молекул был выше, чем при введении конъюгата без адъюванта ( $P < 0,05$ ).

Экспрессия молекул антигенного представления МНС класса II при введении конъюгата дисахарид-БСА с адъювантом и без адъюванта стабильно повышалась только после бустерной иммунизации по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ). Наиболее высокий уровень экспрессии (57,2%) отмечен при введении конъюгата, адсорбированного на геле алюминия гидроксида, по сравнению с конъюгатом без адъюванта (34,1%) при 17,4% в контроле.

Проведен анализ экспрессии поверхностных молекул спленоцитов мышей в ответ на введение конъюгата дисахарид-БСА без адъюванта и с адъювантом в зависимости от срока исследования (1 и 7 сутки) после первой и бустерной иммунизации (*табл. 16, 17*).

**Таблица 16.** Экспрессия поверхностных маркеров на мононуклеарных лейкоцитах селезенки мышей после иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА без адьюванта в зависимости от срока исследования

Поверхностные молекулы спленоцитов, %	Дисахарид-БСА				Контроль
	1-ая иммунизация		2-ая иммунизация		
	1 сутки	7 сутки	1 сутки	7 сутки	
CD3 <sup>+</sup> (Т-клетки)	<u>60,8±3,5</u>	64,3±1,5↑	<u>61,4±3,0</u>	<u>54,8±1,7</u>	57,2±1,9
CD4 <sup>+</sup> (Т-хелперы)	39,3±2,1 ↑	37,5±2,4↑	<u>29,4±2,2</u>	<u>27,1±0,1</u>	25,2±2,2
CD8 <sup>+</sup> (Т-цитотоксические клетки)	<u>23,4±1,0</u>	<u>23,1±2,1</u>	<u>21,6±2,2</u>	<u>25,1±2,0</u>	22,1±0,5
(TCR <sup>+</sup> ) γδТ	5,1±0,3↑	<u>0,5±0,1*</u>	2,5±0,4↑	1,8±0,3↑*	0,6±0,1
CD19 <sup>+</sup> (В-клетки)	<u>18,8±1,2</u>	<u>18,7±2,1</u>	<u>23,7±3,0</u>	<u>24,2±2,0</u>	22,0±2,1
CD5 <sup>+</sup> (В1-клетки)	4,7±0,2↑	<u>2,5±0,5*</u>	4,1±0,8↑	7,8±0,5↑*	2,6±0,2
CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> (NK-клетки)	32,5±1,4 ↑	<u>14,4±2,2*</u>	34,1±2,1↑	26,1±2,9↑*	15,4±1,1
CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> (NKT-клетки)	16,8±2,9 ↑	6,4±0,6↑*	6,4±0,7↑	<u>4,3±0,3*</u>	3,2±0,3
CD25 <sup>+</sup> (рецептор к IL-2)	<u>4,1±0,5</u>	12,9±1,8↑*	20,4±1,8↑	<u>5,8±0,4*</u>	6,4±1,1
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /Foxp3 (регуляторные Т-клетки - Treg)	1,9±0,4↑	2,0±0,5↑	3,1±0,3↑	<u>0,5±0,3*</u>	0,4±0,2
МНСII <sup>+</sup> (молекулы антигенного представления класса II)	<u>22,6±1,9</u>	<u>17,4±2,4</u>	34,7±2,5↑	34,1±1,9↑	17,4±2,1

**Примечание.** Контроль – до иммунизации. ↑ - повышение показателя по сравнению с контролем; Подчеркнуты значения, не имеющие различий с контролем. М±SD. Тест Манна-Уитни. Достоверность различий показателей между 1 и 7 сутками после 1-ой и 2-ой иммунизации соответственно, \*  $P < 0,05$ .

При иммунизации мышей конъюгатом дисахарид-БСА без адьюванта выявлены следующие особенности экспрессии поверхностных молекул на спленоцитах мышей:

- 1) транзитное повышение: CD3<sup>+</sup> (60,8; 64,3↑ и 61,4; 54,8 соответственно, vs 57,2 в контроле) %; CD4<sup>+</sup> (39,3↑; 37,5↑ и 29,4; 27,1 vs 25,2 в контроле) %;
- 2) повышение после 2-ой иммунизации: CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> (32,5↑; 14,4\* и 34,1↑; 26,1↑\* соответственно, vs 15,4 в контроле); МНСII<sup>+</sup> (22,6; 17,4\* и 34,7↑ 34,1↑ соответственно vs 17,4±2,1 в контроле) %; CD5<sup>+</sup> (4,7↑; 2,5\* и 4,1↑; 7,8↑\* vs 2,6 в контроле) %;
- 3) снижение на 7 сутки после 2-ой иммунизации: (TCR<sup>+</sup>) γδТ (5,1↑; 0,5\* и 2,5↑; 1,8\* соответственно vs 0,6 в контроле) %; CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> (16,8↑; 6,4↓\* и 6,4↑; 4,3\* соответственно, vs 3,2 в контроле) %; CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3 (1,9↑; 2,0↑ и 3,1↑; 0,5\* соответственно, vs 0,4 в контроле) %; CD25<sup>+</sup> (4,1; 12,9↑\* и 20,4↑; 5,8\* соответственно, vs 6,4 в контроле) %;
- 4) отсутствие изменений: CD8<sup>+</sup> (23,4; 23,1; 21,6; 25,1 vs 22,1 в контроле); CD19<sup>+</sup> (18,8; 18,7; 23,7; 24,2 vs 22,0 в контроле) %.

При иммунизации мышей конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, выявлены следующие особенности экспрессии поверхностных молекул на спленоцитах мышей:

- 1) стабильное повышение: CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> (1,1↑; 3,0↑\*; 2,4↑; 2,6↑ соответственно, vs 0,4±0,2 в контроле) %;
- 2) транзитное повышение: CD3<sup>+</sup> (65,2↑; 60,4\* и 60,1; 58,8 соответственно, vs 57,2 в контроле) %; CD4<sup>+</sup> (42,2↑; 28,5\* и 24,1; 28,1 vs 25,2 в контроле) %;
- 3) повышение после 2-ой иммунизации: γδТ (TCR) (6,0↑; 0,4\* и 5,8↑; 19,0↑\* соответственно, vs 0,6 в контроле) %; CD5<sup>+</sup> (4,1↑; 2,1\* и 4,5↑; 13,0↑\* соответственно vs 2,6 в контроле); CD19<sup>+</sup> (20,6; 23,4 и 25,9↑; 26,1±1,9↑\* vs 22,0 в контроле) %; МНСII<sup>+</sup> (22,1; 17,2 и 30,2↑; 57,2±3,2↑\* соответственно vs 17,4 в контроле) %.
- 4) снижение на 7 сутки после 2-ой иммунизации: CD8<sup>+</sup> (24,1; 30,8↑\*; 27,0↑; 26,6 соответственно vs 22,1 в контроле) %; CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> (28,0↑; 27,3↑ и

32,2↑; 18,6\* соответственно vs 15,4 в контроле); CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> (8,3↑; 17,5↑\* и 18,4↑; 5,7↑\* vs 3,2 в контроле) %; CD25<sup>+</sup> (11,5↑; 13,7↑ и 19,8↑; 8,2\* соответственно, vs 6,4 в контроле) %.

**Таблица 17.** Экспрессия поверхностных маркеров на мононуклеарных лейкоцитах селезенки мышей после иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, в зависимости от срока исследования

Поверхностные молекулы спленоцитов, %	Дисахарид-БСА+AL				Конт- роль
	1-ая иммунизация		2-ая иммунизация		
	1 сутки	7 сутки	1 сутки	7 сутки	
CD3 <sup>+</sup> (Т-клетки)	65,2±1,4↑	<u>60,4±1,9</u>	<u>60,1±3,1</u>	<u>58,8±2,9</u>	57,2±1,9
CD4 <sup>+</sup> (Т-хелперы)	42,2±1,4↑	<u>28,5±2,1*</u>	<u>24,1±2,3</u>	<u>28,1±2,1</u>	25,2±2,2
CD8 <sup>+</sup> (Т-цитотоксические клетки)	<u>24,1±1,0</u>	30,8±1,9↑	27,0±1,7↑	<u>26,6±3,4</u>	22,1±0,5
γδТ (TCR <sup>+</sup> )	6,0±0,2↑	<u>0,4±0,1*</u>	5,8±0,6↑	19,0±2,1↑*	0,6±0,1
CD19 <sup>+</sup> (В-клетки)	<u>20,6±1,4</u>	<u>23,4±3,3</u>	<u>25,9±2,1</u>	26,1±1,9↑	22,0±2,1
CD5 <sup>+</sup> (В1-клетки)	4,1±0,3↑	<u>2,1±0,2</u>	4,5±0,4↑	13,0±1,7↑*	2,6±0,2
CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> (NK-клетки)	28,0±1,1↑	27,3±2,2↑	32,2±2,2↑	<u>18,6±2,3</u>	15,4±1,1
CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> (NKT-клетки)	8,3±1,2↑	17,5±2,3↑*	18,4±2,3↑	5,7±0,4↑*	3,2±0,3
CD25 <sup>+</sup> (рецептор к IL-2)	11,5±1,1↑	13,7±2,6↑	19,8±1,7↑	<u>8,2±1,4*</u>	6,4±1,1
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /Foxp3 (регуляторные Т-клетки - Treg)	1,1±0,5↑	3,0±0,5↑*	2,4±0,3↑	2,6±0,2↑	0,4±0,2
MHCII <sup>+</sup> (молекулы антигенного представления класса II)	<u>22,1±1,0</u>	<u>17,2±1,7</u>	30,2±1,9↑	57,2±3,2↑*	17,4±2,1

**Примечание.** Контроль – до иммунизации. ↑ - повышение показателя по сравнению с контролем; ↓ - снижение показателя на 7 сутки. Подчеркнуты значения, не имеющие различий с контролем. M±SD. Тест Манна-Уитни. Достоверное повышение или снижение показателя на 7 сутки, \*  $P < 0,05$ .

Сравнительная оценка динамики изменения показателей под действием конъюгированного дисахарида, неадсорбированного и адсорбированного на геле алюминия гидроксида, представлена в *таблице 18*.

**Таблица 18.** Влияние алюминия гидроксида на экспрессию поверхностных молекул спленоцитов мышей

Изменение показателя	Конъюгат	
	Дисахарид-БСА	Дисахарид-БСА+AL
Стабильное повышение	-	CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /Foxp3 Treg
Транзиторное повышение	CD3 <sup>+</sup> Т-клетки CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы	CD3 <sup>+</sup> Т-клетки; CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы
Повышение на 7 сутки после 2-ой иммунизации	CD5 <sup>+</sup> В1-клетки ↑ МНСII <sup>+</sup>	(TCR <sup>+</sup> ) γδТ ↑↑↑; CD5 <sup>+</sup> В1-клетки↑↑; CD19 <sup>+</sup> В-клетки; МНСII <sup>+</sup> ↑
Снижение на 7 сутки после 2-ой иммунизации	γδТ (TCR <sup>+</sup> ); CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> НК; CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> НКТ; CD25 <sup>+</sup> (IL-2R)	CD8 CTL CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> НК; CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> НКТ; CD25 <sup>+</sup> (IL-2R)
Отсутствие изменений	CD8 <sup>+</sup> CTL; CD19 <sup>+</sup> В-клетки	-

**Примечание.** Повышение по сравнению с контролем: ↑ - в 3 раза; ↑↑ - в 5 раз; ↑↑↑ - в 30 раз,  $P < 0,05$ .

Конъюгат дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, вызывал изменение уровня всех исследованных поверхностных молекул, а также более выраженные изменения γδТ (TCR<sup>+</sup>), CD5<sup>+</sup> В1-клеток, CD19<sup>+</sup> В-клеток, молекул антигенного представления МНС класса II на 7 сутки после 2-ой иммунизации. Следует отметить, что экспрессия γδТ (TCR<sup>+</sup>) под действием адсорбированного конъюгата дисахарид-БСА после бустерной иммунизации повышалась в 30 раз - с 0,5% в контроле до 19%; экспрессия молекул CD5<sup>+</sup> В1-клеток повышалась в 5 раз – с 2,6% в контроле до 13,0%; экспрессия молекул МНС класса II увеличивалась в 3 раза – с 17,4% в контроле до 57,2%.

В качестве сравнения исследован уровень экспрессии поверхностных молекул спленоцитов мышей на 14 сутки после 2-кратной иммунизации конъюгатом КП-CRM<sub>197</sub> *S. pneumoniae* серотипа 3, адсорбированным на геле алюминия фосфата, входящим в состав пневмококковой вакцины Превенар 13 (табл.19).

**Таблица 19.** Уровень экспрессии поверхностных маркеров на спленоцитах мышей через 14 суток после 2-ой иммунизации конъюгатом КП-CRM<sub>197</sub>, адсорбированном на геле алюминия фосфата

Поверхностные молекулы спленоцитов, %	Конъюгат	Контроль
	КП-CRM197+AL (Превенар-13)	
CD3 <sup>+</sup> Т-клетки	64,5±2,1*	57,2±1,9
CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы	34,1±2,9*	25,2±2,2
CD8 <sup>+</sup> Т-цитотоксические клетки	27,2±2,1*	16,2±0,5
γδТ-клетки (TCR <sup>+</sup> )	2,2±0,3*	0,6±0,1
CD19 <sup>+</sup> В-клетки	28,1±1,2*	22,0±2,1
CD5 <sup>+</sup> В1-клетки	6,1±0,3*	2,6±0,2
CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> NK-клетки	15,5±3,0	15,4±1,1
NKT CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> NKT-клетки	5,1±0,4	3,2±0,3
CD25 <sup>+</sup> (рецептор к IL-2)	11,3±3,0*	6,4±1,1
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /Foxp3 (Treg)	2,5±0,4*	0,4±0,2
MHCII <sup>+</sup> (молекула антигенного представления класса II)	35,1±4,1*	17,4±2,1

**Примечание.** Контроль – до иммунизации. M±SD. Тест Манна-Уитни. Достоверность различий с контролем, \*  $P < 0,05$ .

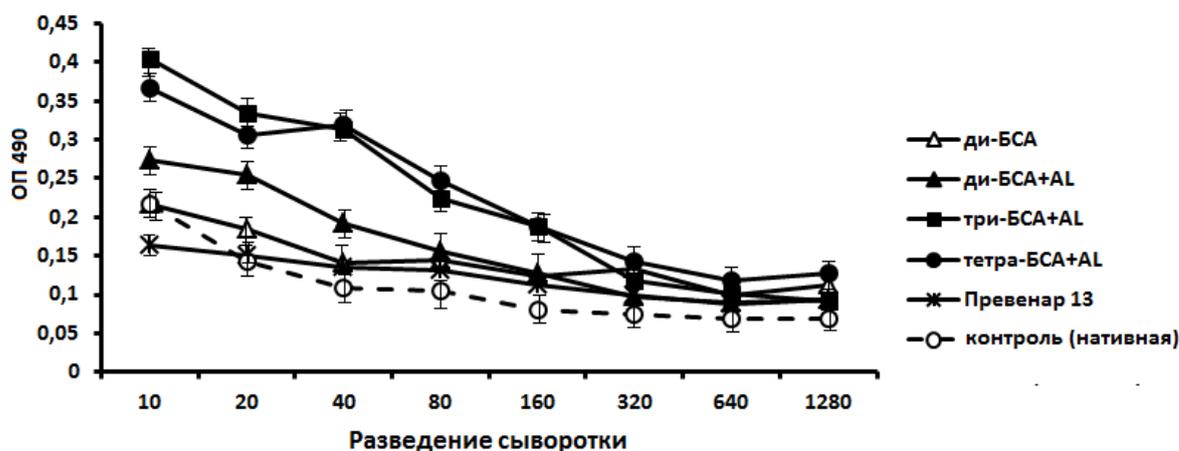
Через 14 суток после двукратной иммунизации КП-CRM<sub>197</sub> *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13) в селезенке мышей повышалось количество клеток, экспрессирующих молекулы CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов; маркеры В-клеток (CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>); молекулы активации CD25<sup>+</sup> (рецептор к интерлейкину-2), молекулы антигенного представления MHCII<sup>+</sup>, регуляторных Т-клеток (Treg), (TCR<sup>+</sup>) γδТ-клеток, тогда как изменений в количестве NK и NKT-клеток не выявлено.

В связи с тем, что γδТ-клетки, CD5<sup>+</sup> В1 и IL-17 участвуют в развитии аутоиммунных реакций [3, 28, 74, 148, 180 ], проведено исследование уровня

антител к двуспиральной ДНК в сыворотке крови иммунизированных мышей.

#### 4.5. Антитела к двуспиральной ДНК

В сыворотках мышей, двукратно иммунизированных конъюгатами ди-, три- и тетрасахарида с БСА, адсорбированными на геле алюминия гидроксида, и конъюгатом CRM<sub>197</sub> с КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13), не выявлено повышения уровня антител к двуспиральной ДНК (разведение сыворотки 1:160, точка отсечения отрицательных результатов  $\leq 0,2$ ), действие которых направлено на разрушение ядер клеток иммунизированных мышей (Рис.5).



**Рис. 5.** Антитела к двуспиральной ДНК у иммунизированных мышей. **Примечание.** АЛ – алюминия гидроксид. Двуспиральную ДНК использовали в ИФА в качестве антигена, иммобилизованного на твердой фазе. Сыворотку к каждому конъюгату и контрольную сыворотку (интактные мыши) вносили в лунки планшетов в разведениях от 1:10 до 1:1280 и измеряли ОП при 490 нм.

Таким образом, ключевыми эффекторами, участвующими в регуляции иммунного ответа на конъюгат дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, являются IL-17A,  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты и CD5<sup>+</sup> В1-лимфоциты при отсутствии образования аутоантител к нативной ДНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции полисахаридными и конъюгированными пневмококковыми вакцинами привела к снижению количества заболеваний, вызываемых серотипами пневмококка, капсульные полисахариды (КП) которых входят в состав вакцин. Однако данные о профилактической эффективности КП *S. pneumoniae* серотипа 3 противоречивы, и ряд из них указывает на его недостаточную иммуногенность [138, 154, 164, 165].

Для повышения иммуногенности КП *S. pneumoniae* серотипа 3 перспективным является использование синтетических олигосахаридов строго определенного химического строения, соответствующих фрагментам протективных эпитопов КП *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированных с белком-носителем для индукции Т-зависимого иммунного ответа.

Синтетические ди-, три- и тетрасахариды, соответствующие одному, полутора и двум повторяющимся звеньям КП *S. pneumoniae* серотипа 3, получены в ФГБУН ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН. Исследуемые олигосахариды конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА) для иммунизации мышей или с биотином для оценки уровня антител к олигосахаридной части конъюгатов методом ИФА.

Наличие общих антигенных детерминант у олигосахаридов и КП *S. pneumoniae* серотипа 3 определяли по способности АТ, индуцированных к КП, взаимодействовать с биотинилированными ди-, три- и тетрасахаридами методом ИФА, а также по способности лигандов олигосахаридов блокировать связывание АТ, специфичных к КП или олигосахаридам, с биотинилированными олигосахаридами или КП, иммобилизованными на твердой фазе, методом ингибирования ИФА.

В результате проведенных исследований установлено, что тетрасахарид, по сравнению с ди- и трисахаридом, активно взаимодействовал с антителами к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3 и не вступал в реакцию с антителами другой углеводной специфичности, а

антитела, индуцированные к тетрасахариду, характеризовались специфичностью к капсульному полисахариду.

На основании этих исследований установлено наличие общих иммунологически активных антигенных структур у тетрасахарида и КП *S. pneumoniae* серотипа 3.

Опсонизирующие IgG-антитела, индуцированные к КП *S. pneumoniae*, являются основными эффекторами иммунного ответа при защите от инфекции, вызванной гомологичным серотипом пневмококка [15, 67, 144, 158, 160, 164, 165, 177, 182]. На примере конъюгата дисахарид-БСА, адсорбированного и неадсорбированного на геле алюминия гидроксида, установлено, что однократная иммунизация мышей является недостаточной для выработки IgG-антител. После двукратной иммунизации IgG-антитела повышались на 7 сутки, достигая максимальных значений через 14 суток после введения гликоконъюгата (срок наблюдения).

Таким образом, показано, что для индукции антител необходимо проведение двукратной иммунизации мышей конъюгатом с адьювантом. Полученные данные явились основанием для использования двукратной схемы иммунизации мышей конъюгатами, адсорбированными на геле алюминия гидроксида, в дальнейших исследованиях.

Способность конъюгатов ди-, три- и тетрасахарида с БСА, адсорбированных на геле алюминия гидроксида, индуцировать адаптивный иммунный ответ оценивали по образованию IgG-антител к олигосахаридной части гликоконъюгатов, их опсонизирующей активности, а также в опытах активной защиты мышей от заражения штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3.

Самый высокий титр IgG-антител углеводной специфичности при использовании КП в качестве антигена в твердофазном ИФА, получен при двукратной внутрибрюшинной иммунизации мышей конъюгатом тетрасахарид-БСА (20 мкг по углеводу на мышь), адсорбированным на геле алюминия гидроксида, по сравнению с адсорбированными конъюгатами ди- и трисахарида.

Ди-, три-, тетра-БСА конъюгаты и конъюгат CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3, входящий в состав 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины (Превенар 13), адсорбированные на солях алюминия, индуцировали выработку IgM-, IgG1-антител. Образование IgG1-антител свидетельствует о поляризации иммунного ответа по Th2 пути. В сыворотках мышей, иммунизированных конъюгатом тетрасахарид-БСА, по сравнению с конъюгатами ди- и трисахарида, определяли большее разнообразие изотипов антител (IgG1, IgG2a, IgG2b). Известно, что IgG2a- и IgG2b-антитела, свидетельствуют о поляризации иммунного ответа Th1 пути и обладают большей опсонизирующей активностью, чем другие изотипы IgG [155]. Одновременное присутствие различных изотипов IgG-антител после иммунизации увеличивает корреляцию между титром антител и уровнем опсонофагоцитоза, а, следовательно, защитой от заражения *S. pneumoniae* [113].

При исследовании опсонизирующей активности антител в сыворотках, полученных к неогликоконъюгатам, процент захваченных инактивированных бактериальных клеток *S. pneumoniae* серотипа 3 нейтрофилами и моноцитами периферической крови интактных мышей был выше, чем после обработки клеток нативной сывороткой. Однако только сыворотка к конъюгату тетрасахарид-БСА, усиливала антитело-зависимый фагоцитоз бактериальных клеток пневмококка в большей степени, чем сыворотка к КП (Превенар 13). Это подтвердилось и в большей способности антител, специфичных к тетрасахариду, агглютинировать живые бактерий *S. pneumoniae* серотипа 3.

Все исследуемые конъюгаты, адсорбированные на геле алюминия гидроксида, защищали мышей от летального заражения штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3. Конъюгаты три- и тетрасахарида с БСА защищали мышей от заражения в 100% случаев; конъюгированный дисахарид - в 87,5% случаев, при 12,5% в контроле.

Для предварительной оценки действия конъюгированных олигосахаридов на активацию врожденного иммунитета исследована способность конъюгатов биотина с ди-, три- и тетрасахаридом, иммобилизованных на планшетах, покрытых стрептавидином, индуцировать продукцию цитокинов в монокультуре спленоцитов неиммунизированных мышей *in vitro*. Все биотинилированные олигосахариды стимулировали продукцию спленоцитами мышей в культуральную среду IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN $\gamma$ , IL-17A и TNF $\alpha$ . Биотинилированный тетрасахарид стимулировал самую высокую продукцию IL-4, IL-10 и IFN $\gamma$  по сравнению с биотинилированными ди- и трисахаридом.

Интересно, что олигосахариды не являются лигандами Толл-подобных рецепторов и при иммобилизации на твердой фазе не могут быть захвачены антигенпрезентирующими клетками с последующей активацией Т-клеток и продукцией цитокинов. Отсутствие лиганд-рецепторного взаимодействия между олигосахаридами и паттернраспознающими рецепторами показано ранее при использовании синтетического гексасахаридом, соответствующего фрагменту КП *S. pneumoniae* серотипа 14 [12]. Вероятно, продукция цитокинов спленоцитами интактных мышей в ответ на действие биотинилированных олигосахаридов, соответствующих фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3, происходила при активации макрофагов. Известно, что макрофаги способны связывать очищенный КП *S. pneumoniae* посредством углеводраспознающего домена маннозного рецептора с последующей продукцией цитокинов IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  и хемокинов [200]. Лектин С-типа (маннозный рецептор) SIGN-R1, экспрессируемый макрофагами в селезенке мышей, способен связывать КП пневмококка разных серотипов [66]. Биотинилированные олигосахариды, соответствующие фрагментами КП *S. pneumoniae* серотипа 3, вероятно, приобретали пространственную конфигурацию и новые свойства после иммобилизации на твердой фазе, что позволяло им эффективно стимулировать спленоциты мышей в культуральной среде с последующей

продукцией цитокинов. Продукция цитокинов усиливалась с увеличением длины олигосахарида. Этот метод можно использовать для предварительной оценки активации врожденного иммунного ответа на соответствующий синтетический олигосахарид или бактериальный КП.

Некоторые цитокины, продуцируемые Т-хелперами, включая IL-4, IL-5, IL-10 и IFN $\gamma$ , способны регулировать экспрессию специфических иммуноглобулинов определенных изотипов. IL-4 и IL-5 переключают синтез IgM- на продукцию IgG1-антител, тогда как IFN $\gamma$  переключает синтез IgM- на продукцию IgG2a- и IgG2b-антител [44, 79]. Это совпадает с полученными нами данными, которые демонстрируют, что при иммунизации мышей конъюгатом тетрасахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, происходило формирование IgG1-, IgG2a-, IgG2b-антител.

Для углубленного исследования молекулярно-клеточного механизма действия неогликоконъюгатов на иммунную систему мышей выбран конъюгат дисахарида с БСА. Дисахарид является повторяющимся звеном и минимальной структурной единицей КП *S. pneumoniae* серотипа 3. В проведенном нами исследовании показано, что конъюгат дисахарид-БСА является менее иммуногенным по сравнению с олигосахаридами с большей длиной цепи. Использование слабоиммуногенного конъюгата позволяет оценить действие адъюванта на усиление его иммуногенных свойств. Влияние конъюгированного дисахарида на иммунную систему мышей исследовали без адсорбции и с адсорбцией конъюгата на геле алюминия гидроксида, так как только в присутствии адъюванта наблюдали образование IgG-антител к дисахариду и защиту мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3.

Уровень продукции цитокинов сыворотке крови мышей и экспрессию поверхностных молекул в монокультуре спленоцитов оценивали через 1 и 7 суток после 1-ой и 2-ой иммунизации конъюгатом дисахарид-БСА.

Спектр и уровень цитокинов был выше в сыворотках мышей, иммунизированных конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле

алюминия гидроксида, по сравнению с конъюгатом без адъюванта. При иммунизации мышей конъюгатом без адъюванта во все сроки исследования повышалась продукция IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13, IL-21, IL-22, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , тогда как IL-5 и IL-10 появлялись после 2-ой иммунизации. Иммунизация мышей конъюгатом, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, кроме перечисленных цитокинов, индуцировала стабильную продукцию IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, 17A. Полученные данные согласуются с результатами профиля цитокинов *in vitro* при использовании биотинилированных олигосахаридов, иммобилизованных на планшете, покрытом стрептавидином. При иммунизации мышей конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным и неадсорбированным на геле алюминия гидроксида, транзиторно повышался IL-2 и не выявлены изменения в продукции IL-12p70.

Особого внимания заслуживает высокая продукция IL-17A. Выявлены контрастные различия в зависимости от присутствия алюминия гидроксида. Конъюгат без адъюванта индуцировал высокий уровень продукции IL-17A через 1 сутки после 1-ой иммунизации (308,3 пг/мл), что в 15 раз превышало контрольное значение (19,3 пг/мл). С 7 суток его уровень начинал снижаться (257 пг/мл). Бустерная иммунизация не оказывала влияния на уровень IL-17A, и на 1 и 7 сутки его концентрация снижалась (222 и 28,9 пг/мл соответственно). Напротив, в присутствии алюминия гидроксида, через 1 сутки после 1-ой иммунизации концентрация IL-17A составляла 1767 пг/мл, к 7 суткам 1356 пг/мл, что было в 91 и 70 раз выше контрольных значений. Бустерная иммунизация не приводила к дальнейшему повышению IL-17A (1336 и 1347 пг/мл на 1 и 7 сутки соответственно), но поддерживала его концентрацию на высоком уровне. Не исключено, что IL-17A играет ключевую роль в иммунном ответе при иммунизации мышей конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида. Известно, что IL-17A, участвует в защите от инфекций, вызванных внеклеточными патогенами, в частности, *S. pneumoniae* [175].

Конъюгат дисахарид-БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, вызывал стабильное изменение уровня поверхностных молекул в культуре спленоцитов мышей, по сравнению с конъюгатом без адьюванта. При иммунизации мышей конъюгатом без адьюванта содержание поверхностных молекул CD8<sup>+</sup> Т- цитотоксических клеток и CD19<sup>+</sup> В-клеток на мононуклеарных лейкоцитах селезенки мышей не отличалось от контрольных значений. Независимо от присутствия адьюванта оба конъюгата вызывали краткосрочное повышение CD3<sup>+</sup> Т-клеток и CD4<sup>+</sup> Т-хелперов. Отличительными признаками конъюгата, адсорбированного на геле алюминия гидроксида, являлась экспрессия молекул (TCR<sup>+</sup>)  $\gamma\delta$  Т, CD5<sup>+</sup> В1-клеток, CD19<sup>+</sup> В-клеток, молекул антигенного представления МНС II<sup>+</sup> на 7 сутки после 2-ой иммунизации, ассоциированной с продукцией опсонизирующих антител и защитой мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3. Экспрессия  $\gamma\delta$  Т (TCR<sup>+</sup>) под действием конъюгата БСА с дисахаридом, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, после бустерной иммунизации повышалась в 30 раз (с 0,5% в контроле до 19%); экспрессия молекул CD5<sup>+</sup> В1-клеток - в 5 раз (с 2,6% в контроле до 13,0%); экспрессия молекул МНС класса II увеличивалась в 3 раза (с 17,4% в контроле до 57,2%), отмечали стабильную экспрессию молекулы CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> Treg. Таких существенных изменений не наблюдали после иммунизации мышей конъюгатом без адьюванта, который не вызвал образования антител и не защищал мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3.

В качестве сравнения исследован уровень экспрессии поверхностных молекул на спленоцитах мышей через 14 суток после 2-кратной иммунизации конъюгатом CRM<sub>197</sub>-КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (Превенар 13), адсорбированным на геле алюминия фосфата. Отмечено повышение всех исследованных поверхностных молекул, за исключением CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> НК и CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> НКТ, уровень которых не отличался от контрольных значений.

Иммунизация мышей конъюгатом дисахарид-БСА или конъюгатом КП-CRM<sub>197</sub> (Превенар 13), приводила к изменению иммунологических показателей, имеющих определенное сходство с изменениями, происходящими при пневмококковой инфекции, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3 у мышей [92, 93].

При пневмококковой инфекции ключевую роль играют  $\gamma\delta$  Т-клетки, НКТ и продукция Th1 и/или Th17-цитокинов [5, 93, 120, 135]. В период инфекции количество  $\gamma\delta$  Т-клеток может существенно увеличиваться, достигая 50% от всех периферических лимфоцитов [48].  $\gamma\delta$  Т-клетки участвуют в защите от *S. pneumoniae* как в начальной в фазе инфекции, так и на стадии разрешения пневмококковой пневмонии, элиминируя мононуклеарные фагоциты из очага воспаления [101], а их отсутствие приводит к увеличению бактериальной нагрузки в легких и гибели животных [120, 135]. Большая часть  $\gamma\delta$  Т-клеток находится в барьерных тканях и лишь небольшая часть в крови и селезенке мышей [12, 14, 78, 178, 179]. Активация  $\gamma\delta$  Т-клеток через Т-клеточный рецептор (TCR) может быть опосредована неклассическими молекулами МНС (т. е. членами семейства T10/T22 и CD1) и не связанными с МНС молекулами [29, 60, 191].  $\gamma\delta$  Т-клетки продуцируют широкий спектр цитокинов и проявляют цитотоксическую активность в отношении патогенов через рецепторы, индуцирующие апоптоз (FAS и TRAIL), и цитолитические белки (перфорин и гранзим) [48], а также могут функционировать как антигенпрезентирующие клетки, требующие взаимодействия с опсонизированными бактериальными клетками. Некоторые  $\gamma\delta$  Т-клетки экспрессируют молекулу CD4.  $\gamma\delta$  Т-клетки с фенотипом Th1 и Th2 продуцируют IL-2, IL-4, IL-17A, IFN $\gamma$  и TNF [60].

Важную роль в защите от пневмококковой инфекции [175] играют CD5<sup>+</sup> В1-клетки, активируемые Т-независимыми антигенами, в том числе, КП пневмококка [121, 124]. Активированные CD5<sup>+</sup> В1-клетки продуцируют естественные антитела, а также могут участвовать в Т-зависимом иммунном ответе [121, 162, 192, 202]. CD5<sup>+</sup> В1-клетки присутствуют в брюшной и

плевральной полости и в очень небольших количествах в селезенке [50]. Рецептор В-клеток (B Cell Receptor - BCR) участвует в фагоцитозе бактерий В1-клетками [65]. CD5<sup>+</sup> В1-клетки, выделенные из селезенки мышей, преимущественно индуцируют продукцию IL-17 Т-клетками [201].

Наряду с защитой от инфекции IL-17,  $\gamma\delta$  Т-клетки и CD5<sup>+</sup> В1-клетки могут способствовать развитию аутоиммунных процессов [28, 43, 74, 147-152, 180]. Экспансию аутореактивных клонов В-клеток контролирует IL-10, оставляя BCR в состоянии анергии.

В настоящем исследовании в ответ на введение конъюгата дисахарид-БСА без адъюванта, а также конъюгатов олигосахаридов и КП, адсорбированных на солях алюминия, не выявлено повышения уровня IgG-антител к двуспиральной ДНК, которые могут приводить к разрушению ядер клеток, вызывая патологические процессы в различных органах.

Исходя из полученных данных, ключевыми эффекторами иммунного ответа при введении конъюгата дисахарид-БСА, адсорбированного на геле алюминия гидроксида, являются олигосахаридспецифические опсонизирующие антитела,  $\gamma\delta$  Т-клетки, CD5<sup>+</sup> В1-лимфоциты, CD19<sup>+</sup> В-лимфоциты при повышении экспрессии молекул антигенного представления МНСII<sup>+</sup>. Регуляция иммунного ответа происходит при участии CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> - Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), стабильно продуцирующих IL-10.

Суммируя результаты проведенных иммунологических исследований, для получения конъюгированной пневмококковой вакцины третьего поколения в качестве синтетического аналога капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 следует использовать тетрасахарид, соответствующий двум повторяющимся звеньям КП, и обладающий высокой иммуногенностью и протективной активностью. Использование синтетического тетрасахарида при конструировании ИФА тест-систем позволит с высокой степенью точности идентифицировать КП *S. pneumoniae* серотипа 3 и выявлять антитела к КП.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что антитела к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3 распознавали тетрасахарид, а антитела к тетрасахариду характеризовались специфичностью к капсульному полисахариду, что свидетельствует о наличии общих антигенных структур у тетрасахарида и капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3.
2. Установлено, что конъюгаты ди-, три- и тетрасахарида с БСА, адсорбированные на геле алюминия гидроксида, при двукратной иммунизации мышей вызывали образование олигосахаридспецифических IgM- и IgG1-антител при наибольшем разнообразии изотипов антител (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b), индуцированных к конъюгату тетрасахарид-БСА, и не стимулировали повышение уровня IgG-антител к двуспиральной ДНК.
3. Отмечено, что антитела к тетрасахариду стимулировали фагоцитоз инактивированных бактерий *S. pneumoniae* серотипа 3 нейтрофилами и моноцитами периферической крови интактных мышей в большей степени, чем антитела к капсульному полисахариду серотипа 3, индуцированные введением конъюгированной 13-валентной пневмококковой вакцины.
4. Выявлено, что протективная активность конъюгатов три- и тетрасахарида, адсорбированных на геле алюминия гидроксида, при заражении иммунизированных мышей *S. pneumoniae* серотипа 3 была выше, чем адсорбированного конъюгата дисахарида (100, 100 и 87,5 % выживших мышей соответственно).
5. Показано, что *in vitro* биотинилированный тетрасахарид, иммобилизованный на твердой фазе, индуцировал более высокую продукцию IL-4, IL-10, IFN $\gamma$  спленоцитами интактных мышей по сравнению с конъюгатами биотина с ди- и трисахаридом; различий в стимуляции продукции IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  между конъюгатами не выявлено.

6. На примере конъюгата дисахарид-БСА, адсорбированного на геле алюминия гидроксида, показана стимуляция у мышей продукции цитокинов: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ; IL-17A в сыворотке крови выявляли в стабильно высокой концентрации, тогда как при введении конъюгата без адъюванта его уровень снижался.
7. Установлено, что после второй иммунизации мышей конъюгатом дисахарид-БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, повышалось содержание спленоцитов, экспрессирующих молекулы (TCR $^+$ )  $\gamma\delta$  Т-клеток, CD5 $^+$  В1-клеток, а также активированных клеток МНС II $^+$ .

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Белошицкий ГВ, Королева ИС. Серотиповая характеристика штаммов *S. pneumoniae* в Москве. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2014, 74(1):90-97.
2. Ванеева НП, Ястребова НЕ. Специфический иммунный ответ к отдельным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae* у здоровых доноров крови и лиц, иммунизированных пневмококковыми вакцинами. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015, 5:20-26.
3. Вишнякова ЛА, Фаустова МЕ, Сологуб ТС. Некоторые вопросы эпидемиологии пневмококковых инфекций. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1988, 8:64-68.
4. Генинг МЛ, Курбатова ЕА, Цветков ЮЕ, Нифантьев НЭ. Разработка подходов к созданию углеводной конъюгированной вакцины третьего поколения против *Streptococcus pneumoniae*: поиск оптимальных олигосахаридных лигандов. Успехи химии. 2015, 8:1100-1113. На англ.: Gening ML, Kurbatova EA, Tsvetkov YuE, Nifantiev NE "Development of approaches to a conjugated carbohydrate vaccine of the third generation against *Streptococcus pneumoniae*: the search for optimal oligosaccharide ligands", Rus Chem Rev. 2015, 84(11):1100–1113.
5. Катосова ЛК. Клинико-биологическая оценка пневмотропной флоры при острых и хронических бронхолегочных болезнях у детей. Автореф. дис. д-ра биол. наук. М.1990, 48 С.
6. Козлов РС, Чагарян АН, Козлова ЛВ, Муравьев АА. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации. Клин микробиол антимикроб химиотер. 2011, 13(2):177- 187.

7. Костюкова НН, Бехало ВА. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014, 3: 67-77.
8. Таточенко ВК, Катосова ЛК, Уланова МА. Периодические и географические различия серотипового спектра пневмококков у детей с респираторными заболеваниями здоровых носителей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1994, 3:3-10.
9. Цветков ЮЕ, Яшунский ДВ, Сухова ЕВ, Курбатова ЕА, Нифантьев НЭ. Синтез олигосахаридов, структурно родственных фрагментам капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* типа 3. Известия Академии наук. Серия химическая. 2017, 1:1-12.
10. Ястребова НЕ, Ванеева НП, Демин АА, Дробышева ВП, Карцова ТЮ, Межевинов ВБ, Полаченко ЕА. Иммуноферментный анализ антител к нативной и денатурированной ДНК. Иммунология. 1987, 5:73-75.
11. Akata K, Chang B, Yatera K, Kawanami T, Yamasaki K, Naito K, Noguchi S, Ishimoto H, Mukae H. Distribution and annual changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes in adult Japanese patients with pneumonia. J Infect Chemother. 2015, 21:723–728.
12. Akhmatova NK, Kurbatova EA, Akhmatov EA, Egorova NB, Logunov DY, Gening ML, et al. The effect of a BSA conjugate of a synthetic hexasaccharide related to the fragment of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14 on the activation of innate and adaptive immune responses. Front Immunol. 2016, 7: Article 248:1-11
13. Al-Jardani A , Al Rashdi A , Al Jaaidi A , Al Balushi M , Al Mahruqi S , Al-Abri S , Al-Maani A , Kumar R . Serotype distribution and antibiotic resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* from Oman post 13-valent vaccine introduction. Int J Infect Dis. 2019, 85:135-140. doi: 10.1016/j.ijid.2019.05.027

14. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991, 9:679–705.
15. Alonso de Velasco E, Dekker HAT, Antal P, Jalink KP, Van Strijp JAG, Verheul AFM, Verhoef J, Snippe H. The adjuvant Quil A improves protection in mice and enhances the opsonic capacity of antisera induced by pneumococcal polysaccharide conjugates. *Vaccine.* 1994, 12:1419–1422.
16. Ananikov VP, Khokhlova EA, Egorov MP, Sakharov AM, Zlotin SG, Kucherov AV, Kustov LM, Gening ML, Nifantiev NE. Organic and hybrid molecular systems. *Mendeleev Commun.* 2015, 25:75–82.
17. Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, Pearce E, Roalfe L, Zancolli M, Slack M, Ladhani SN, Miller E, Goldblatt D. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2014, 14:839–846.
18. Anish C, Schumann B, Pereira CL, Seeberger PH. Chemical biology approaches to designing defined carbohydrate vaccines. *Chem Biol.* 2014, 21:38–50.
19. Athlin S, Kaltoft M, Slotved HC, Herrmann B, Holmberg H, Konradsen HB, Strålina K. Association between serotype-specific antibody response and serotype characteristics in patients with pneumococcal pneumonia, with special reference to degree of encapsulation and invasive potential. *Clin Vaccine Immunol.* 2014, 21:1541–1549
20. Avci FY, Kasper DL. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu Rev Immunol.* 2010, 28:29–52.
21. Avci FY, Li X, Tsuji M, Kasper DL. Carbohydrates and T cells: A sweet twosome. *Semin Immunol.* 2013, 25(2): 146–151. doi:10.1016/j.smim.2013.05.005
22. Avci FY, Li XM, Tsuji M, Kasper DL. A mechanism for glycoconjugate

- vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. *Nat Med.* 2011, 17:1602–1610.
23. Avery OT, Goebel WF. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III pneumococcus with foreign protein. *J Exp Med.* 1931, 54:437–447.
  24. Bake PJ, Hiernaux JR, Fauntleroy MB, Stashak PW, Prescott B, Cantrell JL, Rudbach JA. Ability of monophosphoryl lipid A to augment the antibody response of young mice. *Infect Immun.* 1988, 56:3064–3066.
  25. Barthelson R, Mobasser A, Zopf D, Simon P. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides. *Infect Immun.* 1998, 66:1439-1444.
  26. Benaissa-Trouw B, Lefeber DJ, Kamerling JP, Vliegenthart JFG, Kraaijeveld K, Snippe H. Synthetic polysaccharide type 3-related di-, tri-, and tetrasaccharide–CRM197 conjugates induce protection against *Streptococcus pneumoniae* type 3 in mice. *Infect Immun.* 2001, 69(7):4698–4701.
  27. Bender JM, Ampofo K, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, Mason EO, Byington CL. Pneumococcal necrotizing pneumonia in Utah: does serotype matter? *Clin Infect. Dis.* 2008, 46:1346–1352.
  28. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 2002, 20:253–300. doi:10.1146/annurev. immunol.20.100301.064833
  29. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010, 10: 467–478.
  30. Briles DE, Claflin JL, Schroer K, Forman C. Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Nature.* 1981, 294:88–90.

31. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1992, 60:111–116.
32. Brodeur PH and Wortis HH. Regulation of thymus-independent responses: unresponsiveness to a second challenge of TNP-Ficoll is mediated by hapten-specific antibodies. *J Immunol*. 1980, 125:1499–1505.
33. Broecker F, Hanske J, Martin CE, Baek JY, Wahlbrink A, Wojcik F, Hartmann L, Rademacher C, Anish C, Seeberger PH. Multivalent display of minimal *Clostridium difficile* glycan epitopes mimics antigenic properties of larger glycans. *Nat Commun*. 2016, 7:11224. doi: 10.1038/ncomms11224.
34. Broecker F, Martin CE, Wegner E, Mattner J, Baek JY, Pereira CL, Anish C, Seeberger PH. Synthetic lipoteichoic acid glycans are potential vaccine candidates to protect from *Clostridium difficile* infections. *Cell Chem Biol*. 2016, 23: 1014–1022.
35. Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis*. 2004, 190:1203–1211.
36. Byington CL, Korgenski K, Daly J, Ampofo K, Pavia A, Mason EO. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumonic empyema. *Pediatr Infect Dis J*. 2006, 25:250–254.
37. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis*. 2010, 202:29–38.
38. Campbell JH and Pappenheimer AM. Quantitative studies of the specificity of anti-pneumococcal polysaccharide antibodies, type III and VIII. I. Isolation of oligosaccharides from acid and from enzymatic hydrolysates. *Immunochemistry*. 1966, 3:195-212.
39. Cartee RT, Forsee WT, Schutzbach JS, Yother J. Mechanism of type 3

- capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem. 2000, 275:3907–3914.
40. Cartee RT, Forsee WT, Yother J. Initiation and synthesis of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 capsule on a phosphatidylglycerol membrane anchor. J Bacteriol. 2005, 187:4470–4479.
  41. Chiba N. Current status of invasive pneumococcal diseases and the preventive pneumococcal vaccines in Japan. Jpn J Chemother. 2011, 59:561–672.
  42. Choi EH, Zhang F, Lu Y-J, Malleya R. Capsular polysaccharide (CPS) release by serotype 3 pneumococcal strains reduces the protective effect of anti-type 3 CPS antibodies. Clin Vaccine Immunol. 2016, 23(2):162–167.
  43. Choi YS, Baumgarth N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. J Exp Med. 2008, 205(13):3053–3064. doi:10.1084/jem.20080979
  44. Coffman RL, Savelkoul HF, Lebman DA. Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. Semin Immunol. 1989, 1:55-63.
  45. Colman G, Hallas G. Systemic disease caused by pneumococci. J Infect. 1983, 7: 248–255.
  46. Dagan R, Eskola J, Leclerc C, Leroy O. Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. Infect Immun. 1998, 66:2093–2098.
  47. Daly TM, Pickering JW, Zhang X, Prince HE, Hill HR. Multilaboratory assessment of threshold versus fold-change algorithms for minimizing analytical variability in multiplexed pneumococcal IgG measurements. Clin Vaccine Immunol. 2014, 21:982–988.
  48. Das H, Groh V, Kuijl C, et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. Immunity. 2001,15(1):83–93.

49. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM, Weeranta R. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol.* 1998, 160:870–876.
50. Deenen GJ, Kroese FG. Kinetics of peritoneal B-1a cells (CD5 B cells) in young adult mice. *Eur J Immunol.* 1993, 23(1):12–16. doi:10.1002/eji.1830230104
51. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournie JJ, Krensky AM, et al. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis.* 2001,184:1082–1085.
52. Dillard JP, Vandersea MW, Yother J. Characterization of the cassette containing genes for type 3 capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med.* 1995, 181:973–983.
53. Dochez AR, Gillespie LJ. A biologic classification of pneumococci by means of immunity reactions. *J Am Med Assoc.* 1913, 61:727–732.
54. Douglas RM, Paton JC, Duncan SJ, Hansman DJ. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis.* 1983, 148:131–137.
55. Elhaik-Goldman S, Kafka D, Yossef R, Hadad U, Elkabets M, et al. The natural cytotoxicity receptor 1 contribution to early clearance of *Streptococcus pneumoniae* and to natural killer-macrophage cross talk. *PLoS ONE.* 2011, 6: e23472.
56. Elias Md. Endotoxins: current understanding on potency testing and low endotoxin/lipopolysaccharide recovery (LER/LLR). List Labs. March 6. 2017. <https://www.listlabs.com/blog/low-endotoxin-recovery-low-lipopolysaccharide-recovery/>
57. Emmadi M, Khan N, Lykke L, Reppe K, Parameswarappa SG, Lisboa MP, Wienhold SM, Witzenrath M, Pereira CL, Seeberger PH. A

- Streptococcus pneumoniae* type 2 oligosaccharide glycoconjugate elicits opsonic antibodies and is protective in an animal model of invasive pneumococcal disease. *J Am Chem Soc.* 2017, 139:14783–14791.
58. España PP , Uranga A , Ruiz LA , Quintana JM , Bilbao A , Aramburu A , Serrano L , Ayarza R , Martinez AP , Zalacain R . Evolution of serotypes in bacteremic pneumococcal adult pneumonia in the period 2001-2014, after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine in Bizkaia (Spain). *Vaccine.* 2019, 37(29):3840-3848.
59. Feng S, Xiong C, Wang S, Guo Z, Gu G. Semi-synthetic glycoconjugate vaccines to elicit T cell-mediated immune responses and protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. *ACS Infect Dis.* 2019, 5(8): 1423-1432.
60. Ferreira LM. Gammadelta T cells: innately adaptive immune cells? *Int Rev Immunol.* 2013, 32(3):223-48. doi: 10.3109/08830185.2013.783831
61. Finland M, Barnes MW. Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J Clin Microbiol.* 1977, 5: 154–166.
62. Finland M, Sutliff WD. Specific antibody response of human subjects to intracutaneous injection of pneumococcus products. *J Exp Med.* 1932, 55(6):853-865.
63. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, et al. CD1d restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med.* 2003, 197: 1051–1057.
64. Galli G, Pittoni P, Tonti E, Malzone C, Uematsu Y, et al. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 104: 3984–3989.
65. Gao J, Ma X, Gu W, Fu M, An J, Xing Y, et al. Novel functions of murine B1 cells: active phagocytic and microbicidal abilities. *Eur J Immunol.* 2012, 42(4):982–992. doi:10.1002/eji.201141519

66. Gavin K. Paterson and Tim J. Mitchell. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology*. 2006, 152:285–293. doi:10.1099/mic.0.28551-0
67. Goldblatt D, Plikaytis BD, Akkoyunlu M, Antonello J, Ashton L, Blake M, Burton R, Care R, Durant N, Feavers I, Fernsten P, Fievet F, Giardina P, Jansen K, Katz L, Kierstead L, Lee L, Lin J, Maisonneuve J, Nahm MH, Raab J, Romero-Steiner S, Rose C, Schmidt D, Stapleton J, Carlone GM. Establishment of a new human pneumococcal standard reference serum, 007sp. *Clin Vaccine Immunol*. 2011, 18:1728–1736.
68. Grabenstein JD, Musey LK. Differences in serious clinical outcomes of infection caused by specific pneumococcal serotypes among adults. *Vaccine*. 2014, 32:2399–2405.
69. Gransden WR, Eykyn SJ, Phillips I. Pneumococcal bacteraemia: 325 episodes diagnosed at St Thomas's Hospital. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985, 290:505–508.
70. Greenspan NS, Cooper LNJ. Intermolecular cooperativity: a clue to why mice have IgG3? *Immunol Today*. 1992,13:164–168.
71. Gruber WC, Scott DA, Emini EA. Development and clinical evaluation of Prevnar 13, a 13-valent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine. *Ann NY Acad Sci*. 2012, 1263:15–26.
72. Guidolin A, Morona JK, Morona R, Hansman D, Paton JC. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infect Immun*. 1994, 62:5384–5396.
73. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 1995, 13:1263–1276.
74. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*. 2005,

- 23(1):7–18. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.011
75. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 2005, 73:4653–4667.
  76. Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, Valentiner-Branth P, Christensen JJ, Lambertsen L, Krogfelt KA, Konradsen HB, Benfield TL. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med.* 2009; 6(5):e1000081. doi: 10.1371/journal.pmed.1000081.
  77. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive diseases: implications for conjugate vaccine formulation and use. *Clin Infect Dis.* 2000, 30:100-121.
  78. Havran WL, Allison JP. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T cell antigen receptors. *Nature* 1988, 335:443–445.
  79. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother.* 2015, 11:477–488.
  80. Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of pneumococcus. *J Exp Med.* 1923, 38:73–79.
  81. Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of pneumococcus: second paper. *J Exp Med.* 1924, 40:301–317. doi:10.1084/jem.40.3.301
  82. Heidelberger M, Goebel WF, Avery OT. The soluble specific substance of Friedlander's bacillus : paper II. Chemical and immunological relationships of pneumococcus type II and of a strain of friedlander's bacillus. *J Exp Med.* 1925, 42(5):709-725.
  83. Heidelberger M, Goebel WF. The soluble specific substance of pneumococcus. *J Biol Chem.* 1927, 74: 613–618.
  84. Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of

- pneumococcus. *J Exp Med.* 1924, 40: 301-317.
85. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000, 408:740–745.
86. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1995, 33: 2759–2762.
87. Henriques B, Kalin M, Ortqvist A, Olsson Liljequist B, Almela M, Marrie TJ, Mufson MA, Torres A, Woodhead MA, Svenson SB, Källenius G. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J Infect Dis.* 2000, 182(3): 833–839.
88. Hilgers LA, Snippe H. DDA as an immunological adjuvant. *Res Immunol.* 1992, 143:494–503.
89. Idänpään-Heikkilä I, Simon PM, Zopf D, Vullo T, Cahill P, Sokol K, Tuomanen E. Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 1997, 176: 704-712.
90. Inostroza J, Vinet AM, Retamal G, Lorca P, Ossa G, Facklam RR, Sorensen RU. Influence of patient age on *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001, 8(3):556–559.
91. Inverarity D, Lamb K, Diggle M, Robertson C, Greenhalgh D, Mitchell TJ, Smith A, Jefferies JMC, Clarke SC, McMenemy J, Edwards GFS. Death or survival from invasive pneumococcal disease in Scotland: associations with serogroups and multilocus sequence types. *J Med Microbiol.* 2011, 60: 793–802.
92. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho Fernandez E, Van Maele L, et al. Key role for respiratory CD103(+) dendritic cells, IFN-gamma, and IL-17 in protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in response to alphagalactosylceramide. *J Infect Dis.* 2012, 206: 723–734.

93. Ivanov S, Paget C, Trottein F. Role of Non-conventional T lymphocytes in respiratory infections: the case of the pneumococcus. *PLoS Pathog.* 2014, 10(10): e1004300. doi:10.1371/journal.ppat.1004300
94. Jakob T, Walker PS, Krieg AM, von Stebut E, Udey MC, Vogel JC. Bacterial DNA and CpG-containing oligodeoxynucleotides activate cutaneous dendritic cells and induce IL-12 production: implications for the augmentation of Th1 responses. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999, 118: 457–461.
95. Jansen WT, Snippe H. Short-chain oligosaccharide protein conjugates as experimental pneumococcal vaccines. *Indian J Med Res.* 2004, 119(Suppl): 7-12.
96. Jansen AG, Hak E, Veenhoven RH, Damoiseaux RA, Schilder AG, Sanders EA. Pneumococcal conjugate vaccines for preventing otitis media. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009, 2:CD001480. doi: 10.1002/14651858.CD001480.pub3
97. Kamerling JP. Pneumococcal polysaccharides: A chemical view. In: Tomasz A, editor. *Streptococcus pneumoniae*, molecular biology & mechanisms of disease. New York: Mary Ann Liebert. 1999, pp. 81-114.
98. Kaplonek P, Khan N., Reppe K, Schumann B, Emmadi M, Lisboa MP, Xu F-F, Calow ADJ, Parameswarappa SG, Witzenrath M, Pereira CL, Seeberger PH. Improving vaccines against *Streptococcus pneumoniae* using synthetic glycans. *PNAS.* 2018, 115 (52): 13353-13358.
99. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, Miyagi K, Nakasone C, et al. Critical role of V $\alpha$ 14<sup>+</sup> natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol.* 2003, 33: 3322–3330.
100. Kawasaki S, Aoki N. A case of severe community-acquired pneumonia caused by mucoid type *Streptococcus pneumoniae*. *Ann Jpn Resp Soc.* 2015, 4:303–308.

101. Kirby AC, Newton DJ, Carding SR, Kaye PM. Pulmonary dendritic cells and alveolar macrophages are regulated by gammadelta T cells during the resolution of *S. pneumoniae*-induced inflammation. *J Pathol.* 2007, 212(1):29-37. doi: 10.1002/path.2149
102. Kobrynski LJ, Sousa AO, Nahmias AJ, Lee FK. Cutting edge: antibody production to pneumococcal polysaccharides requires CD1 molecules and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 2005, 174(4):1787-90. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.1787
103. Kolkman MA, Wakarchuk W, Nuijten PJ, van der Zeijst BA. Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete cps locus and identification of genes encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. *Mol Microbiol.* 1997, 26:197–208.
104. Komarova BS, Wong SSW, Orekhova MV, Tsvetkov Yu E, Krylov VB, Beauvais A, Bouchara J-Ph, Kearney JF, Amanianda V, Latgé J-P, Nifantiev NE. Chemical synthesis and application of biotinylated oligo- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)-D-glucosides to study the antibody and cytokine response against the cell wall  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)-D-glucan of *Aspergillus fumigatus*. *J Org Chem.* 2018, 83:12965–12976.
105. Kroese FG, Ammerlaan WA, and Deenen GJ. Location and function of B-cell lineages. *Ann NY Acad Sci.* 1992, 651:44–58.
106. Kronenberg A, Zucs P, Droz S, Mühlemann K. Distribution and invasiveness of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Switzerland, a country with low antibiotic selection pressure, from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol.* 2006, 44(6):2032-2038.
107. Kurbatova EA, Akhmatova NK, Akhmatova EA, Egorova NB, Yastrebova NE, Sukhova EV, Yashunsky DV, Tsvetkov YE, Gening ML, Nifantiev NE. Neoglycoconjugate of tetrasaccharide representing one repeating unit of the *Streptococcus pneumoniae* type 14 capsular

- polysaccharide induces the production of opsonizing IgG1 antibodies and possesses the highest protective activity as compared to hexa- and octasaccharide conjugates. *Front Immunol.* 2017, 8:1-13.
108. Kuroki T, Ishida M, Suzuki M, Furukawa I, Ohya H, Watanabe Y, Konnai M, Aihara Y, Chang B, Ariyoshi K, Oishi K, Ohnishi M, Morimoto K. Outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 pneumonia in extremely elderly people in a nursing home unit in Kanagawa, Japan, 2013. *J Am Geriatr Soc.* 2014, 62(6):1197–1198.
  109. Kölsch E, Podlaski FJ, Gately MK, Rude E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol.* 1995, 25: 823–829.
  110. Laferrière CA, Sood RK, de Muys JM, Michon F, Jennings HJ. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. *Vaccine.* 1997,15:179–186.
  111. Laughlin JM, Jiang Q, Gessner BD, Swerdlow DL, Sings HL, Isturiz RE, Jodar L. Pneumococcal conjugate vaccine against serotype 3 pneumococcal pneumonia in adults: A systematic review and pooled analysis. *Vaccine.* 2019, 37(43):6310-6316.
  112. Lee S, Lee K, Kang Y, Bae S. Prevalence of serotype and multidrug-resistance of *S. pneumoniae* respiratory tract isolates in 265 adult and 36 children in Korea, 2002-2005. *Microb Drug Resist.* 2010, 16(2):135-142.
  113. Lefeber DJ, Benaissa-Trouw B, Vliegthart JF, et al. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect Immun.* 2003, 71(12):6915-6920. doi:10.1128/iai.71.12.6915-6920
  114. Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004, 82:497–505.

115. Linley E, Bell A, Gritzfeld JF, Borrow R. Should pneumococcal serotype 3 be included in serotype-specific immunoassays? *Vaccines (Basel)*. 2019, 7:4. pii: E4. doi: 10.3390/vaccines7010004
116. Lisboa MP, Khan N, Martin C, Xu FF, Reppe K, Geissner A, Govindan S, Witzernath M, Pereira CL, Seeberger PH. Semisynthetic glycoconjugate vaccine candidate against *Streptococcus pneumoniae* serotype 5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017, 114:11063–11068.
117. Lodi L, Ricci S, Nieddu F, Moriondo M, Lippi F, Canessa C, Mangone G, Cortimiglia M, Casini A, Lucenteforte E, Indolfi G, Resti M, Azzari C. Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on severe invasive disease caused by serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *Vaccines*. 2019, 7(4):128.
118. Louçano J, Both P, Marchesi A, del Bino L, Adamo R, Flitschband S, Salwiczek M. Automated glycan assembly of *Streptococcus pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide fragments. *Adv*. 2020, 10: 23668–23674. doi: 10.1039/d0ra01803a
119. Lund E, Henrichsen J. Phenotypic characterization and serotypes identification of CSF isolates in acute bacterial meningitis. *Methods Microbiol*. 1978, 12:241–262
120. Ma J, Wang J, Wan J, Charboneau R, Chang Y, et al. Morphine disrupts interleukin-23 (IL-23)/IL-17-mediated pulmonary mucosal host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2010, 78: 830–837.
121. Margry B, Wieland WH, van Kooten PJ, van Eden W, Broere F. Peritoneal cavity B-1a cells promote peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell activation. *Eur J Immunol*. 2013, 43(9):2317–26. doi:10.1002/eji.201343418
122. Martens P, Worm SW, Lundgren B, Konradsen HB, Benfield T. Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infect Dis*. 2004, 4: 21.

123. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*. 2009, 31: 321–330.
124. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 2001, 14(5):617–29. doi:10.1016/S1074-7613(01)00129-7
125. McLay J, Leonard E, Petersen S, Shapiro D, Greenspan NS, Schreiber JR. 3 gene-disrupted mice selectively deficient in the dominant IgG subclass made to bacterial polysaccharides. II. Increased susceptibility to fatal pneumococcal sepsis due to absence of anti-polysaccharide IgG3 is corrected by induction of anti-polysaccharide IgG1. *J Immunol*. 2002, 168:3437–3443.
126. Mitchison NA. T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol*. 2004, 4:308–312.
127. Miyasaka T, Akahori Y, Toyama M, Miyamura N, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kinjo Y, Miyazaki Y, Oishi K, Kawakami K. Dectin-2-dependent NKT cell activation and serotype-specific antibody production in mice immunized with pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One*. 2013, 25:8(10). e78611. doi: 10.1371/journal.pone.0078611
128. Miyasaka T, Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, et al. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine*. 2012, 30: 3304–3310.
129. Moingeon P, Haensler J, Lindeberg A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine*. 2001, 19:4363–4372.
130. Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol*. 1995, 7:349–354.
131. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, Petit S, Zansky SM, Harrison LH, Reingold A, Miller L,

- Scherzinger K, Thomas A, Farley MM, Zell ER, Taylor TH, Jr, Pondo T, Rodgers L, McGee L, Beall B, Jorgensen JH, Whitney CG. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis.* 2015, 15:301–309.
132. Morimoto K, Suzuki M, Ishifuji T, Yaegashi M, Asoh N, Hamashige N, Abe M, Aoshima M, Ariyoshi K. Adult pneumonia study group-Japan (APSG-J). The burden and etiology of community-onset pneumonia in the aging Japanese population: a multicenter prospective study. *PLoS ONE.* 10(3):e0122247.doi: 10.1371/journal.pone.0122247. eCollection 2015.
133. Morona JK, Morona R, Paton JC. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2006, 103: 8505–8510.
134. Nakamatsu M, Yamamoto N, Hatta M, Nakasone C, Kinjo T, et al. Role of interferon-gamma in Valpha14<sup>+</sup> natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect.* 2007, 9: 364–374.
135. Nakasone C, Yamamoto N, Nakamatsu M, Kinjo T, Miyagi K, et al. Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection. *Microbes Infect.* 2007, 9(3):251-258. doi:10.1016/j.micinf.2006.11.015
136. Namkoong H, Ishii M, Funatsu Y, Kimizuka Y, Yagi K, Asami T, Asakura T, Suzuki S, Kamo T, Fujiwara H, Tasaka S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Theory and strategy for pneumococcal vaccines in the elderly. *Hum Vaccin Immunother.* 2016, 12:336–343.
137. Neuberger MS, Rajewski K. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol.* 1981, 11:1012–1016.
138. Nurkka A, Joensuu J, Henckaerts I, Peeters P, Poolman J, Kilpi T, Käyhty

- HM. Immunogenicity and safety of the eleven valent pneumococcal polysaccharide-protein D conjugate vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2004, 11:1008–1014.
139. Ostergaard C, Brandt C, Konradsen HB, Samuelsson S. Differences in survival, brain damage, and cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models. *J Infect Dis.* 2004, 190:1212–1220.
140. Parameswarappa SG, Reppe K, Geissner A, Me'nova'P , Govindan S, Calow ADJ, Wahlbrink A, Weishaupt MW, Monnanda BP, Bell RL, Pirofski L-A, Suttorp N, Sander LE, Witzenrath M, Pereira CL, Anish C, Seeberger PH. A Semi-synthetic oligosaccharide conjugate vaccine candidate confers protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 infection. *Cell Chem Biol.* 2016, 23:1407–1416.
141. Pasteur L. Note sur la maladie nouvelle provoquee per la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med (Paris).* 1881, 10:94–103.
142. Pecetta S, Lo Surdo P, Tontini M, Proietti D, Zambonelli C, Bottomley MJ, Biagini M, Berti F, Costantino P, Romano MR. Carrier priming with CRM197 or diphtheria toxoid has a different impact on the immunogenicity of the respective glycoconjugates: biophysical and immunochemical interpretation. *Vaccine.* 2015, 33:314–320.
143. Pecetta S, Tontini M, Faenzi E, Cioncada R, Proietti D, Seubert A, Nuti S, Bert F, Romano MR. Carrier priming effect of CRM197 is related to an enhanced B and T cell activation in meningococcal serogroup A conjugate vaccination. Immunological comparison between CRM197 and diphtheria toxoid. *Vaccine.* 2016, 34:2334–2341.
144. Pletz MW, Maus U, Krug N, Welte T, Lode H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *Int J Antimicrob Agents.* 2008, 32:199–206.

145. Polonskaya Z, Deng S, Sarkar A, Kain L, Comellas-Aragones M, McKay CS, Kaczanowska K, Holt M, McBride R, Palomo V, Self KM, Taylor S, Irimia A, Mehta SR, Dan JM, Brigger M, Crotty S, Schoenberger SP, Paulson JC, Wilson IA, Savage PB, Finn MG, Teyton L. T cells control the generation of nanomolar-affinity antiglycan antibodies. *J Clin Invest.* 2017, 127:1491–1504.
146. Poolman J, Kriz P, Feron C, Di-Paolo E, Henckaerts I, Miseur A, Wauters D, Prymula R, Schuerman L. Pneumococcal serotype 3 otitis media, limited effect of polysaccharide conjugate immunisation and strain characteristics. *Vaccine.* 2009, 27(24):3213-3222.
147. Popi AF, Godoy LC, Xander P, Lopes JD, Mariano M. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. *Microb Infect.* 2008, 10(7):817–24. doi:10.1016/j.micinf.2008.04.012
148. Popi AF, Longo-Maugéri IM, Mariano M. An Overview of B-1 cells as antigen-presenting cells. *Front. Immunol.* 2016, 7:138. doi:10.3389/fimmu.2016.00138
149. Popi AF, Motta FLT, Mortara RA, Schenkman S, Lopes JD, Mariano M. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. *Immunology* 2009, 126(1):114–122. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02883.x
150. Popi AF, Osugui L, Perez KR, Longo-Maugeri IM, Mariano M. Could a B-1 cell derived phagocyte “be one” of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? *PLoS One.* 2012, 7(3):e34570. doi:10.1371/journal.pone.0034570
151. Popi AF, Zamboni DS, Mortara RA, Mariano M. Microbicidal property of B1 cell derived mononuclear phagocyte. *Immunobiology.* 2009, 214(8):664–673.
152. Popi AF. B-1 phagocytes: the myeloid face of B-1 cells. *Ann N Y Acad*

- Sci. 2015, 1362:86–97. doi:10.1111/nyas.12814
153. Pozsgay V. Oligosaccharide-protein conjugates as vaccine candidates against bacteria. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2000, 56:153–199.
  154. Prymula R, Peeters P, Chrobok V, Kriz P, Novakova E, Kaliskova E, Kohl I, Lommel P, Poolman J, Prieels J-P, Schuerman L. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D provide protection against otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomized double blind efficacy study. *Lancet.* 2006, 367(9512):740–748.
  155. Ravetch JV, J-P Kinet. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991, 9:457–492.
  156. Reeves RE, Goebel WE. Chemoimmunological studies on the soluble specific substrate of pneumococcus. *J Biol Chem.* 1941, 139:511–519.
  157. Reppe K, Tschernig T, Luhrmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Muller HC, Kursar M, Schutte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzernath M. Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009, 40:474–481.
  158. Romero-Steiner S, Frasch C, Concepcion N, Goldblatt D, Käyhty H, Väkeväinen M, Laferriere C, Wauters D, Nahm MH, Schinsky MF, Plikaytis BD, Carlone GM. Multilaboratory evaluation of a viability assay for measurement of opsonophagocytic antibodies specific to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003, 10:1019–1024.
  159. Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, Nahm MH. Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. *Clin Vaccin Immunol.* 2006, 13:165–169.
  160. Rose CE, Romero-Steiner S, Burton RL, Carlone GM, Goldblatt D, Nahm MH, Ashton L, Haston M, Ekström N, Haikala R, Käyhty H, Henckaerts I,

- Durant N, Poolman JT, Fernsten P, Yu X, Hu BT, Jansen KU, Blake M, Simonetti ER, Hermans PW, Plikaytis BD. Multilaboratory comparison of *Streptococcus pneumoniae* opsonophagocytic killing assays and their level of agreement for the determination of functional antibody activity in human reference sera. *Clin Vaccine Immunol.* 2011, 18: 135–142.
161. Safari D, Dekker HAT, Joosten AF. Identification of the smallest structure capable of evoking opsonophagocytic antibodies against *S. pneumoniae* type 14. *Infect Immun.* 2008, 76 : 4615–4623.
162. Sato T, Ishikawa S, Akadegawa K, Ito T, Yurino H, Kitabatake M, et al. Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur J Immunol.* 2004, 34(12):3346–3358. doi:10.1002/eji.200425373
163. Schuerman L, Prymula R, Chrobok V, Dieussaert I, Poolman J. Kinetics of the immune response following pneumococcal PD conjugate vaccination. *Vaccine.* 2007, 25:1953–1961.
164. Schuerman L, Prymula R, Henckaerts I, Poolman J. ELISA IgG concentrations and opsonophagocytic activity following pneumococcal protein D conjugate vaccination and relationship to efficacy against acute otitis media. *Vaccine.* 2007, 25(11):1962–1968.
165. Schuerman L, Wysocki J, Tejedor JC, Knuf M, Kim K-H, Poolman J. Prediction of pneumococcal conjugate vaccine effectiveness against invasive pneumococcal disease using opsonophagocytic activity and antibody concentrations determined by enzyme-linked immunosorbent assay with 22F adsorption. *Clin Vaccin Immunol.* 2011, 18: 2161–2167.
166. Schumann B, Anish C, Pereira CL, Seeberger PH. Carbohydrate vaccines. *Biotherapeutics: Recent developments using chemical and molecular biology*, eds Jones L, McKnight AJ. Royal Society of Chemistry. 2013, 68–104.

167. Schumann B, Hahm HS, Parameswarappa SG, Reppe K, Wahlbrink A, Govindan S, Kaplonek P, Pirofski LA, Witzentrath M, Anish C, Pereira CL, Seeberger PH. A semisynthetic *Streptococcus pneumoniae* serotype 8 glycoconjugate vaccine. *Sci Transl Med.* 2017, 9(380):eaaf5347.
168. Schumann B, Reppe K, Kaplonek P, Wahlbrink A, Anish C, Witzentrath M, Pereira CL, Seeberger PH. Development of an efficacious, semisynthetic glycoconjugate vaccine candidate against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1. *ACS Cent Sci.* 2018, 4:357–361.
169. Scott JA, Hall AJ, Dagan R, Dixon JM, Eykyn SJ, Fenoll A, Hortal M, Jetté LP, Jorgensen JH, Lamothe F, Latorre, C, Macfarlane JT, Shlaes DM, Smart LE, Taunay A. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clin Infect Dis.* 1996, 22(6): 973–981.
170. Seeberger PH, Pereira CL, Khan N, Xiao G, Diago-Navarro E, Reppe K, Opitz B, Fries BC, Witzentrath M. A semi-synthetic glycoconjugate vaccine candidate for Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017, 56: 13973–13978.
171. Sharon N, Ofek I. Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconj J.* 2000, 17: 659-664.
172. Shiramoto M, Hanada R, Juergens C, Shoji Y, Yoshida M, Ballan B, Cooper D, Gruber WC, Scott DA, Schmoele-Thoma B. Immunogenicity and safety of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in elderly Japanese adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2015, 11(9):2198–2206.
173. Sidorenko S, Rennert W, Lobzin Y, Briko N, Kozlov R., et al. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020,96(1):114914. doi:

- 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114914
174. Simonsen V, Brandão AP, Brandileone MCC, Yara TI, Di Fabio JL, Lopes MH, Jacob Filho W. Immunogenicity of a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in Brazilian elderly. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005, 38: 251-260.
  175. Sindhava VJ, Bondada S. Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Front Immunol*. 2012, 3:372. doi: 10.3389/fimmu.2012.00372
  176. Snippe H, Van Houte A-J, Van Dam JEG, De Reuver MJ, Jansze M, Willers JMN. Immunogenic properties in mice of hexasaccharide from the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect Immun*. 1983, 40(3):856-861.
  177. Song JY, Moseley MA, Burton RL, Nahm MH. Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody. *J Infect Chemother*. 2013, 19:412–425.
  178. Sperling AI, Cron RQ, Decker DC, Stern DA, Bluestone JA. Peripheral T cell receptor  $\gamma\delta$  variable gene repertoire maps to the T cell receptor loci and is influenced by positive selection. *J Immunol*. 1992, 149(10):3200–3207.
  179. Strominger JL. Developmental biology of T cell receptors. *Science*. 1989, 244(4907):943–950.
  180. Su D, Shen M, Li X, Sun L. Roles of  $\gamma\delta$  T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013, 2013:985753. doi: 10.1155/2013/985753
  181. Sugimoto N, Yamagishi Y, Hirai J, Sakanashi D, Suematsu H, Nishiyama N, Koizumi Y, Mikamo H. Invasive pneumococcal disease caused by mucoid serotype 3 *Streptococcus pneumoniae*: a case report and literature review. *BMC Res Notes*. 2017, 10(1):21.
  182. Tian H, Weber S, Thorkildson P, Kozel TR, Pirofski L.-A. Efficacy of

- opsonic and nonopsonic serotype 3 pneumococcal capsular polysaccharide-specific monoclonal antibodies against intranasal challenge with *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun.* 2009, 77:1502–1513.
183. Thompson A, Lamberth E, Severs J, Scully I, Tarabar S, Ginis J, Jansen KU, Gruber WC, Scott DA, Watson W. Phase 1 trial of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine.* 2019 37(42):6201-6207. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.08.048
184. Tonti E, Fedeli M, Napolitano A, Iannaccone M, von Andrian UH, et al. Follicular helper NKT cells induce limited B cell responses and germinal center formation in the absence of CD4(+) T cell help. *J Immunol.* 2012, 188: 3217–3222.
185. Tontini M, Berti F, Romano MR, Proietti D, Zambonelli C, Bottomley MJ, de Gregorio E, Del Giudice G, Rappuoli R, Costantino, P; Study Group, Brogioni G, Balocchi C, Biancucci M, Malito E. Comparison of CRM197, diphtheria toxoid and tetanus toxoid as protein carriers for meningococcal glycoconjugate vaccines. *Vaccine.* 2013, 31:4827–4833.
186. Tsvetkov YuE, Gening ML, Kurbatova EA, Akhmatova NK, Nifantiev NE. Oligosaccharide ligand tuning in design of third generation carbohydrate pneumococcal vaccines. *Pure Appl Chem.* 2017, 89(10). doi:10.1515/pac-2016-1123
187. Ukkonen P, Varis K, Jernfors M, Herva E, Jokinen J, Ruokokoski E, Zopf D, Kilpi T. Treatment of acute otitis media with an antiadhesive oligosaccharide: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2000, 356:1398-1402.
188. Valiante NM, O'Hagan DT, Ulmer JB. Innate immunity and biodefence vaccines. *Microreview. Cell Microbiol.* 2003, 5(11):755–760.
189. Van Dam JE, Fleer A, Snippe H. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Van*

- Leeuwenhoek. 1990, 58:1-47.
190. Van de Wijkert JH, Verheul AF, Snippe H, Check IJ, Hunter RL. Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide: influence of carriers and adjuvants on isotype distribution. *Infect Immun.* 1991, 59:2750–2757.
  191. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 2013, 13: 88–100.
  192. Wang Y, Rothstein TL. Induction of Th17 cell differentiation by B-1 cells. *Front Immunol.* 2012, 3:281. doi:10.3389/fimmu.2012.00281
  193. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EA, Ndiritu M, Klugman KP, Rückinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2010, 51(6):692–699.
  194. Weishaupt MW, Matthies S, Hurevich M, Pereira CL, Hahm HS, Seeberger PH. Automated glycan assembly of a *S. pneumoniae* serotype 3 CPS antigen. *Beilstein J Org Chem.* 2016, 12:1440–1446.
  195. Witzernath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM., Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2011, 187:434–440.
  196. Wuorimaa T, Kayhty H, Leroy O, Eskola J. Tolerability and immunogenicity of an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine in adults. *Vaccine* 2001, 19:1863–1869.
  197. Xiong C, Feng S, Qiao Y, Guo Z, Gu G. Synthesis and immunological studies of oligosaccharides that consist of the repeating unit of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 capsular polysaccharide. *Chem Eur*

- J. 2018, 24(32):8205-8216.
198. Yu XH, Sun Y, Frasch C, Concepcion N, Nahm MH. Pneumococcal capsular polysaccharide preparations may contain non-C-polysaccharide contaminants that are immunogenic. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999, 6:519–524.
  199. Zaccaro DJ, Wagener DK, Whisnant CC, Staats HF. Evaluation of vaccine-induced antibody responses: Impact of new technologies. *Vaccine.* 2013, 31:2756–2761.
  200. Zamz S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SYC. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002, 277(44):41613–41623.
  201. Zhong X, Gao W, Degauque N, Bai C, Lu Y, Kenny J, et al. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol.* 2007, 37(9):2400–2404. doi:10.1002/eji.200737296
  202. Zimecki M, Kapp JA. Presentation of antigen by B cell subsets. II. The role of CD5 B cells in the presentation of antigen to antigen-specific T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1994, 42(5–6):349–53.