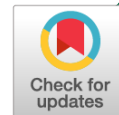


УДК 615.371

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ635351>

ГИБРИДНАЯ МУЛЬТИЭПИТОПНАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОТ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ СТРЕПТОКОККАМИ ГРУППЫ В

Г.Ф. Леонтьева, Т.А. Крамская, И.В. Королева, Е.В. Кулешевич, Н.В. Дуплик, А.Н. Суворов

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Королева И.В., Кулешевич Е.В., Дуплик Н.В., Суворов А.Н. Гибридная мультиэпитопная рекомбинантная вакцина для защиты от инфекции, вызванной стрептококками группы В // Медицинский академический журнал. 2024. Т. 24. № 4. С. 60–73. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ635351>

Рукопись получена: 23.08.2024

Рукопись одобрена: 30.09.2024

Опубликована online: 27.12.2024

Обоснование. *Streptococcus agalactiae*, широко известный как стрептококк группы В, — важный патоген, ответственный за тяжелые, а иногда и смертельные инвазивные инфекции у новорожденных. Он также представляет существенный риск для пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом. Современные профилактические стратегии в первую очередь включают использование антибиотиков для предотвращения передачи стрептококка группы В от матери плоду и для лечения уже установившихся инфекций. Появление штаммов, устойчивых к антибиотикам, снизило эффективность этих методов лечения и сделало очевидной необходимость применения альтернативных профилактических мер. Вакцины представляют собой многообещающее дополнение к антибиотикам, потенциально обеспечивая более широкую и эффективную защиту от инфекций, вызванных стрептококками группы В.

Цель — исследование направлено на оценку иммуногенных свойств и защитной эффективности недавно разработанной химерной рекомбинантной белковой вакцины, предназначенной для борьбы с инфекциями, вызванными стрептококками группы В (Su4). Вакцина включает иммунодоминантные эпитопы пяти белков — факторов вирулентности стрептококков группы В. В работе исследованы различные пути вакцинации мышей с последующим анализом эффективности индуцированного иммунного ответа при защите от различных форм инфекции, вызванной стрептококками группы В.

Материалы и методы. Самок беспородных мышей (в возрасте 6–8 нед.) иммунизировали подкожно, интраназально или интравагинально гибридным рекомбинантным вакцинным полипептидом Su4 в дозе 20 мкг с повторным введением в той же дозе через 21 день. Образцы крови брали из подчелюстной вены на 20-й и 40-й день после иммунизации. Иммуногенность оценивали путем измерения уровней специфических IgG, IgG1, IgG2a и IgG3 с помощью иммуоферментного анализа. Планшеты покрывали белком Su4 или рекомбинантными пептидными аналогами каждого из пяти участков комплексной молекулы Su4 и определяли концентрации антител с использованием стандартных кривых. Защитную эффективность оценивали по бактериальной нагрузке в легких и вагинальных смывах мышей, инфицированных штаммом стрептококка группы В 6224 назальным или вагинальным путем в дозе 10^8 КОЕ на одно животное. Концентрацию бактерий в легочных гомогенатах и вагинальных смывах определяли путем посева материала на колумбийский кровяной агар.

Результаты. Изучена защитная эффективность вакцинации полиэпитопной молекулой Su4, состоящей из линейных детерминант пяти белков стрептококка группы В. Иммунизация подкожным, интраназальным и вагинальным способами показала, что белок Su4 был иммуногенным и вызывал выработку специфического IgG. Подкожная иммунизация обеспечивала накопление самого высокого уровня антител. Иммунный ответ развивался по типу Th2 и преимущественно приводил к индукции IgG1 антител, потенциально способных опсонизировать бактерии и инициировать фагоцитоз. Вакцинация обеспечивала ускоренное выведение стрептококка группы В из полости влагалища мышей после инфекции по сравнению с контрольной группой, демонстрируя защитную эффективность стимулированного иммунного ответа в защите против инфекций, вызванных стрептококками группы В.

Заключение. Полиэпитопный химерный рекомбинантный белок Su4 иммуногенен при подкожном, интраназальном и вагинальном введении и индуцирует системный IgG-ответ, специфичный в отношении белков стрептококка группы В. Этот ответ повышает устойчивость к назальной и вагинальной формам инфекции, вызванной стрептококком группы В, что позволяет рассматривать Su4 в качестве перспективной кандидатной мультиэпитопной вакцины против стрептококков группы В.

Ключевые слова: стрептококки группы В; гибридная рекомбинантная вакцина; защитная эффективность; мукозальная вакцинация.

HYBRID MULTIEPITOPE RECOMBINANT VACCINE FOR PROTECTION AGAINST INFECTION CAUSED BY GROUP B STREPTOCOCCUS

Gallina F. Leontieva, Tatyana A. Kramskaya, Irina V. Koroleva, Evgenia V. Kuleshevich, Nadezhda V. Duplik, Alexander N. Suvorov

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Leontieva GF, Kramskaya TA, Koroleva IV, Kuleshevich EV, Duplik NV, Suvorov AN. Hybrid multiepitope recombinant vaccine for protection against infection caused by group B streptococcus. *Medical Academic Journal*. 2024;24(4):60–73. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ635351>

Received: 23.08.2024

Accepted: 30.09.2024

Published online: 27.12.2024

BACKGROUND: *Streptococcus agalactiae*, commonly known as group B streptococcus, is an important pathogen responsible for severe and sometimes fatal invasive infections in newborns. It also poses a significant risk to older adults and those with weakened immune systems. Current preventive strategies primarily include the use of antibiotics to prevent maternal-to-fetal transmission of group B streptococcus and to treat established infections. The emergence of antibiotic-resistant strains has reduced the effectiveness of these treatments and highlighted the need for alternative preventive measures. Vaccines represent a promising complement to antibiotics, potentially providing broader and more effective protection against group B streptococcus infections.

AIM: The study aims to evaluate the immunogenic properties and protective efficacy of a newly developed chimeric recombinant protein vaccine (Su4) designed to combat group B streptococcus infections. This vaccine incorporates immunodominant epitopes from five group B streptococcus virulence factor proteins. The research investigated various vaccination methods in mice, followed by an analysis of the effectiveness of the induced immune response in providing protection against multiple forms of group B streptococcus infection.

MATERIALS AND METHODS: Female outbred mice (6–8 weeks of age) were immunized subcutaneously, intranasally, or intravaginally with a hybrid recombinant vaccine polypeptide Su4 at a dose of 20 µg with repeated administration at the same dose after 21 days. Blood samples were taken from the submandibular vein on days 20 and 40 after immunization. Immunogenicity was assessed by measuring the levels of specific IgG, IgG1, IgG2a and IgG3 using ELISA. The plates were coated with Su4 protein or recombinant peptide analogs of each of the five regions of the Su4 complex molecule, and antibody concentrations were determined using standard curves. Protective efficacy was assessed by the bacterial load in the lungs and vaginal lavages of mice infected with the group B streptococcus strain 6224 nasally or vaginally at a dose of 10^8 CFU/mouse. Bacterial concentrations in lung homogenates and vaginal washings were determined by plating the material on Columbia blood agar.

RESULTS: The study examined the protective effectiveness of vaccination with the polypeptide molecule Su4, consisting of linear determinants of five group B streptococcus proteins. Immunization by subcutaneous, intranasal and vaginal routes showed that the Su4 protein was immunogenic and caused the production of specific IgG. Subcutaneous immunization ensured the accumulation of the highest levels of antibodies. The immune response developed according to the Th2 type and predominantly led to the induction of IgG1 antibodies, potentially capable of opsonizing bacteria and initiating phagocytosis. Vaccination resulted in accelerated clearance of group B streptococcus from the vaginal cavity of mice following infection compared with the control group, demonstrating the protective effectiveness of the stimulated immune response in protecting against group B streptococcus infections.

CONCLUSIONS: The polypeptide chimeric recombinant protein Su4 is immunogenic via subcutaneous, intranasal, and vaginal administration, inducing a systemic IgG response specific to group B streptococcus proteins. This response enhances resistance to nasal and vaginal group B streptococcus infections, indicating that Su4 is a promising candidate for a multi-epitope vaccine against group B streptococcus.

Keywords: group B streptococcus; hybrid recombinant vaccine; protective efficacy; mucosal vaccination.

Обоснование

Стрептококки группы В (СГВ), или *Streptococcus agalactiae*, — этиологические агенты разнообразных бактериальных инфекций, угрожающих жизни беременных женщин, младенцев, людей преклонного возраста и лиц с ослабленным иммунитетом [1–6]. Появление антибиотикорезистентных штаммов бактерий снижает эффективность применения антибиотиков для профилактики передачи СГВ от матери к плоду или терапии развившейся инфекции у детей и взрослых [7–9].

Назначение антибиотиков беременным женщинам перед родами может предотвратить развитие СГВ инфекции с ранним (0–6 дней) началом, но не снижает риск развития инфекции с поздним началом (7–90 дней), когда передача СГВ происходит в процессе кормления или ухода за ребенком [10, 11]. Несмотря на меры лекарственной профилактики, по данным Всемирной организации здравоохранения, СГВ-инфекция ежегодно приводит к гибели более 90 тыс. новорожденных. Риск развития дисбиотических состояний как следствие антибиотикотерапии также крайне высок.

Эффективным средством в системе профилактики СГВ-носительства у матерей и развития инфекций у новорожденных могут стать вакцины. Задача создания вакцины от СГВ-инфекции в 2021 г. выделена Всемирной организацией здравоохранения в качестве одного из приоритетных научных направлений. По некоторым расчетам, применение СГВ-вакцин помимо решения задач защиты здоровья матери и ребенка будет приносить реальную экономическую выгоду [12–14].

В 80-х годах XX в. была испытана на людях первая полисахаридная СГВ-вакцина [15], несколько позже были созданы и исследованы конъюгированные вакцины, в которых для повышения иммуногенности препарата полисахариды были связаны с субъединицей холерного токсина [16–20].

Несколько вакцин против СГВ в настоящее время проходят клинические испытания, которые фокусируются на иммунизации матерей для защиты младенцев. Это гексавалентная полисахаридная конъюгированная вакцина, нацеленная на шесть бактериальных серотипов GBS6, от компании Pfizer [21], белковая вакцина

GBS-NN компании GlaxoSmithKline [22], белковая вакцина GBS компании Minervax [23].

В отсутствие лицензированных СГВ-вакцин не прекращается поиск новых вакцинных препаратов, при этом белковые вакцины имеют хорошие перспективы, поскольку не зависят от серотиповой специфичности стрептококков [24–26].

Ранее мы показали, что комбинация пяти рекомбинантных белков-аналогов пяти поверхностных белков СГВ может стать основой для вакцины широкого спектра действия [27]. В развитие этих исследований были созданы образцы рекомбинантной мультиэпитопной вакцины — химерной молекулы, содержащей участки иммунодоминантных фрагментов пяти стрептококковых белков.

Первоначально были сконструированы четыре рекомбинантных гибридных молекулы (Su1, Su2, Su3, Su4), состоящие из иммунодоминантных участков пяти белковых факторов вирулентности СГВ. Конструкции включали в себя различные фрагменты СГВ белков Bac, CspA, ScpB (C5a-пептидаза), ScaAB и SspB1. Часть гибридных молекул содержала внутренний адъювант-фрагмент сальмонеллезного белка флагеллина, обладающего адъювантными свойствами и высокой иммуногенностью [28]. Участки стрептококковых белков были выбраны на основе компьютерного анализа с помощью пакета программ The Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB), ExPASy, дизайн молекул создавали с использованием алгоритма I-Tasser CASPs (Critical Assessment of protein Structure Prediction). Сравнительный анализ [29] показал, что при подкожной иммунизации мышей в присутствии экзогенного адъюванта (соли алюминия) конструкции были в различной степени иммуногенны и протективны в случае внутрибрюшинной СГВ-инфекции. Для дальнейшего исследования в качестве вакцинного кандидата был выбран химерный рекомбинантный белок Su4 (рис. 1), ранее показавший высокий уровень иммуногенности и не содержащий в своей структуре участок сальмонеллезного флагеллина.

Цель — проанализировать иммуногенные свойства рекомбинантного белка Su4 при разных способах вакцинации, а также представить

данные о протективной эффективности специфического иммунного ответа при интраназальной и интравагинальной СГВ-инфекции.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия роста. В качестве возбудителя СГВ-инфекции использовали клинический изолят из вагинальных мазков (штамм 6224 GBS серотип V), принадлежащий коллекции Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург). Согласно анализу методом полимеразной цепной реакции, этот штамм содержал гены, кодирующие все пять белков, входящих в химерный белок (неопубликованные данные). Бактерии выращивали в бульоне Тодда — Хьюитта (T1438 Sigma-Aldrich) в течение ночи в аэробных условиях при 37 °C. Концентрацию бактерий определяли методом посева разведений бактерий на колумбийский кровяной агар (BioMedia, Россия).

Полипептиды. Рекомбинантная гибридная молекула Su4 (рис. 1) была получена ранее [29] с использованием методов, аналогичных ранее описанным для синтеза рекомбинантного химерного кандидата пневмококковой вакцины [30].

Вкратце, с помощью пакета программ IEDB были отобраны консервативные фрагменты пяти белков СГВ (Bac, CspA, ScpB (C5a-пептидаза), ScaAB и SspB1), содержащие эпитопы В- и Т-клеток. Аминокислотная последовательность химерных белков была разработана *in silico*, предсказание искусственной структуры белка было выполнено с использованием алгоритма I-Trasser. Синтез нуклеотидной последовательности химерного белка был выполнен путем удлинения перекрывающихся олигонуклеотидов [31]. Синтетический химерный ген был клонирован в векторе pET24b + (Invitrogen), в результате чего получена экспрессионная плазмида pPSPF, которая была трансформирована в *Escherichia coli* BL21 (Invitrogen).

Иммунизация мышей и сбор образцов. Самки беспородных мышей в возрасте 6–8 нед. были приобретены в лабораторно-племенном питомнике НИЦ «Курчатовский институт» (Рапполово, Ленинградская область, Россия). Экспериментальные процедуры соответствовали принципам, изложенным в Директиве ЕС

	ScaAB	ScpB	Bac	CspA	SspB1	Su2
Flagellin	ScaAB	ScpB	Bac	CspA	SspB1	Su4

Рис. 1. Схема и последовательность фрагментов Bac, CspA, ScpB (C5a пептидаза), ScaAB и SspB1 в составе гибридных молекул белков Su2 и Su4

Fig. 1. Schematic representation and sequence alignment of fragments Bac, CspA, ScpB (C5a peptidase), ScaAB, and SspB1 within the hybrid protein molecules Su2 and Su4

2010/63/EU, для экспериментов на животных и были одобрены и проведены в соответствии с руководящими принципами и под контролем локального Комитета по биомедицинской этике.

Подкожная вакцинация. Мышам ($n = 12$) подкожно в область шеи вводили 20 мкг раствора белка Su4 в 200 мкл физиологического буферного раствора (PBS). Иммунизацию повторяли через 21 день. Контрольным мышам ($n = 12$) подкожно вводили 200 мкл PBS.

Интраназальная вакцинация. Мышам ($n = 12$) интраназально в обе ноздри вводили 20 мкг раствора белка Su4 в 20 мкл PBS. Иммунизацию повторяли через 21 день. Контрольным мышам ($n = 12$) интраназально вводили 20 мкл PBS.

Вагинальная вакцинация. Мышам ($n = 24$) интравагинально вводили 20 мкг раствора белка Su4 в 20 мкл PBS. Иммунизацию повторяли через 21 день. Контрольным мышам ($n = 24$) интравагинально вводили 20 мкл PBS.

Образцы крови брали из подчелюстной вены на 20-й и 40-й день от начала вакцинации.

Анализ эффективности вакцины. На 45-й день от начала вакцинации контрольных и вакци-

нированных мышей заражали путем назальной инъекции СГВ 6224 в дозе 10^8 КОЕ на одно животное в объеме 20 мкл. Инфекционный процесс контролировали путем подсчета СГВ в легких или вагинальной полости. Легкие собирали и гомогенизировали в PBS с помощью шаровой вибрационной мельницы Retsch MM-400. Серийные 10-кратные разведения гомогенатов готовили в PBS и определяли концентрацию бактерий в гомогенатах путем посева разведений на колумбийский кровяной агар (BioMedia, Россия). Бактериальную нагрузку в вагинальных смывах, полученных путем промывания вагинальной полости 50 мкл PBS, определяли таким же образом. Часть контрольных ($n = 12$) и иммунизированных мышей ($n = 12$) заражали СГВ, штамм 6224, путем вагинального введения бактерий в дозе 10^8 КОЕ на одно животное в 20 мкл PBS.

Определение специфических иммуноглобулинов. Уровни специфических IgG, IgG1, IgG2a, IgG3 определяли методом иммуноферментного анализа в 96-луночных планшетах (Nunc), покрытых белком Su4 или рекомбинантными пептидными аналогами составных фрагментов Su4 (2 мкг/мл), в течение ночи при 4°C . В дублирующие лунки добавляли серию двукратных разведений образца (100 мкл) и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C . Добавляли меченые пероксидазой хрена козы антимышинные антитела IgG (Sigma), разведенные в блокирующем буфере в соответствии с инструкциями производителя (100 мкл на лунку). После инкубации при 37°C в течение 1 ч планшеты обрабатывали 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (BD Bioscience) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию Ig вычисляли по стандартным кривым, как это было сделано ранее [30].

Статистический анализ. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Statistica версии 8.0. (StatSoft, США). Средние значения и стандартные ошибки средних значений рассчитывали при определении концентрации IgG и количества бактерий. Статистически значимые различия между группами определяли с помощью ANOVA или при ненормально распределенных данных непараметрическим U-критерием Манна – Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Иммуногенные свойства гибридного белка Su4 исследовали при подкожном, интраназальном и интравагинальном путях иммунизации. Экспериментальным мышам всеми указанными способами по единому протоколу вводили одинаковое количество белка без какого-либо экзогенного адъюванта. На 20-й день

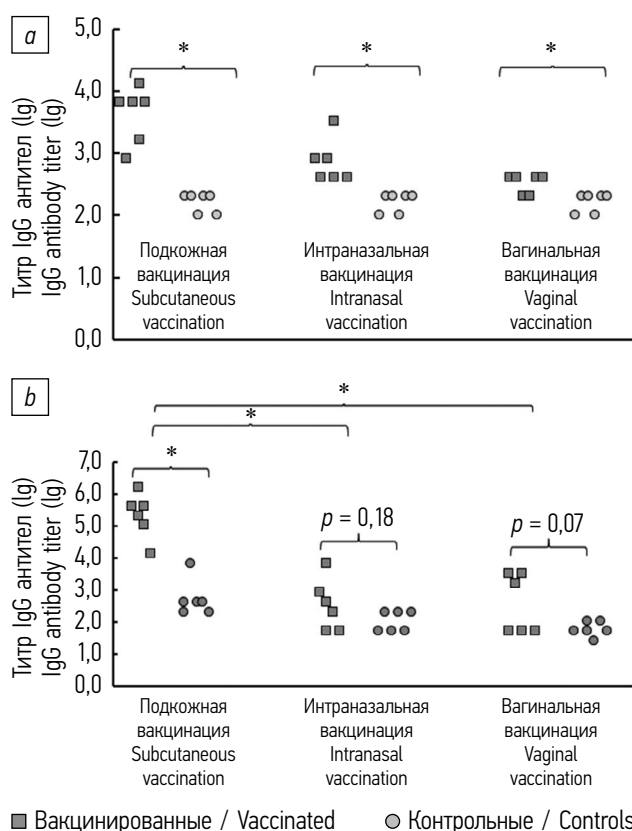


Рис. 2. Уровень IgG в сыворотке крови на 20-й день после однократного введения белка Su4 (a); после повторного введения белка Su4 (b). * Статистически достоверные отличия, $p < 0,05$

Fig. 2. IgG levels in blood serum: on day 20 following a single injection of Su4 protein (a); after repeated administration of Su4 protein (b). * Statistically significant differences, $p < 0.05$

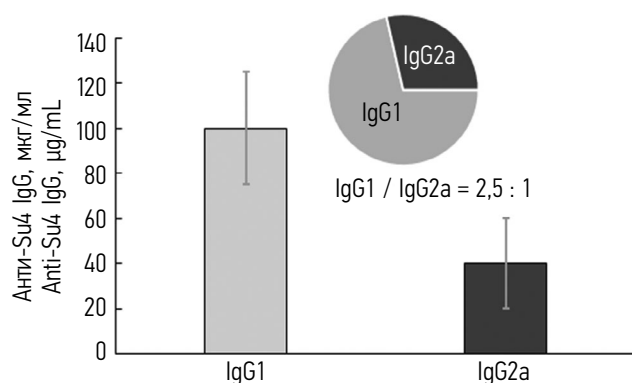


Рис. 3. Соотношение уровня антител подклассов IgG1 и IgG2a после подкожной иммунизации мышей белком Su4

Fig. 3. Ratio of IgG1 to IgG2a subclass antibody levels following subcutaneous immunization of mice with the Su4 protein

в сыворотках крови иммунизированных мышей во всех экспериментальных группах был зарегистрирован достоверный уровень специфических IgG (рис. 2, а). Максимальный иммунный ответ отмечен при подкожном, минимальный — при вагинальном способе введения.

Повторная иммунизация вызвала дальнейшее накопление специфических антител в циркуляции. Подкожная иммунизация обеспечивала достоверный по отношению к контролю и обоим мукозальным способам вакцинации прирост уровня специфических антител класса G (рис. 2, b). При интраназальном и интравагинальном способах введения также было выявлено превышение титра специфических антител у вакцинированных животных, хотя при имеющемся численном основании отличия между контрольными и иммунными сыворотками не достигали уровня достоверности.

В сыворотках, полученных после подкожной иммунизации мышей, был определен состав пула IgG антител оценки соотношения IgG1 и IgG2a. Количественную оценку уровня антител давали с помощью калибровочных кривых, построенных с использованием стандартов мышинных IgG1 и IgG2a. Основная доля Su4 специфических антител была представлена подклассом IgG1 (рис. 3).

Белок Su4 представляет собой искусственно сконструированный гибридный полипептид, в состав которого входят линейные антигенные детерминанты белков, принадлежащих СГВ. Мы показали, что в пуле Su4-специфических IgG присутствовали антитела к белкам СГВ, фрагменты которых вошли в состав химерной молекулы. На рис. 4 представлены результаты иммуноферментного анализа, в котором титрование одних и тех же сывороток вели на планшетах с сорбированными рекомбинантными

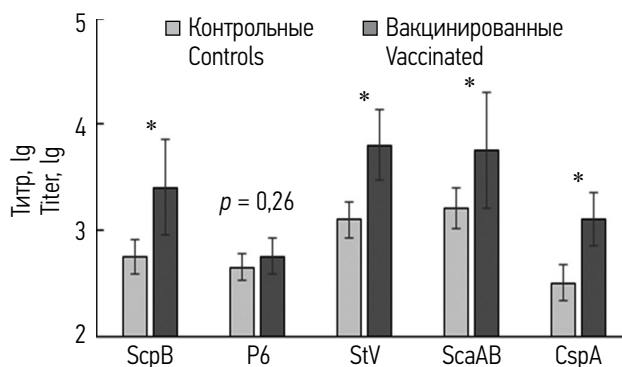
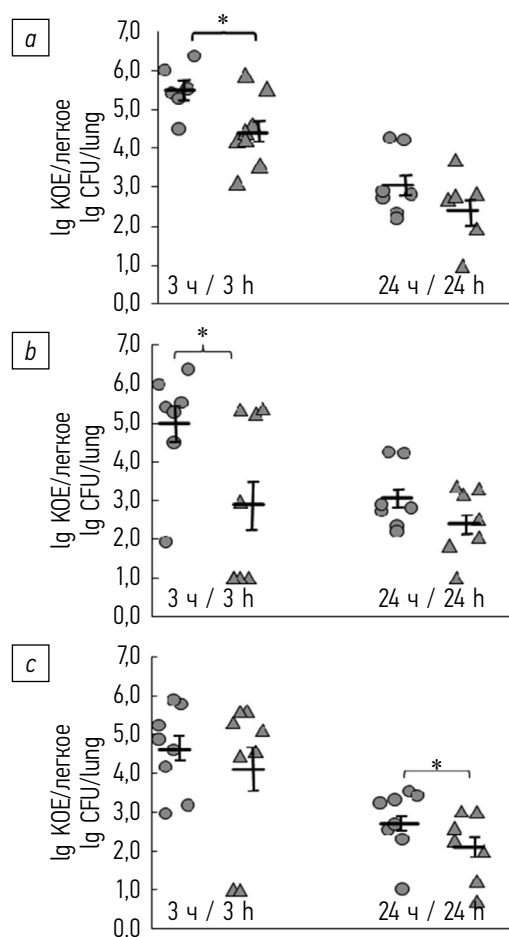


Рис. 4. Уровень антител к рекомбинантным белкам, входящим в состав химерного белка Su4. *Статистически достоверные отличия, $p < 0,05$

Fig. 4. Antibody levels against recombinant proteins incorporated into the chimeric protein Su4. *Statistically significant differences, $p < 0.05$



○ Контрольные Controls ■ Вакцинированные Vaccinated — Среднее значение Average value

Рис. 5. Содержание стрептококков группы В в легких после интраназального заражения в группах мышей, иммунизированных подкожно (a), интраназально (b) и интравагинально (c). *Статистически достоверные отличия, $p < 0,05$

Fig. 5. Quantification of group B streptococcus GBS in the lungs after intranasal challenge in groups of mice immunized via subcutaneous (a), intranasal (b), and intravaginal (c) routes. *Statistically significant differences, $p < 0.05$

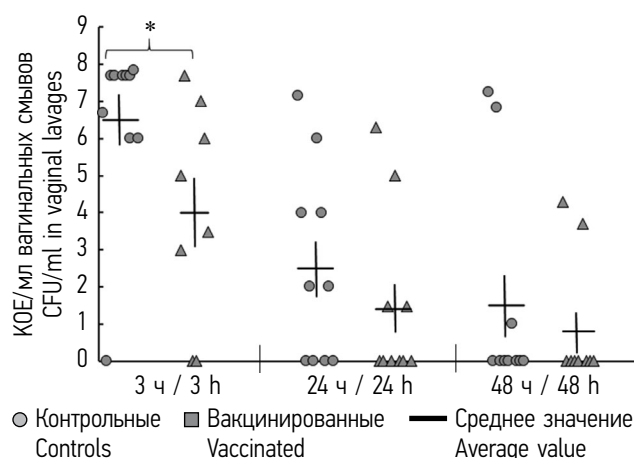


Рис. 6. Содержание стрептококков группы В в вагинальных смывах через 3, 24 и 48 ч после вагинального заражения. *Статистически достоверные отличия, $p < 0,05$

Fig. 6. Quantification of group B streptococcus in vaginal lavages at 3, 24, and 48 hours post-vaginal infection. *Statistically significant differences, $p < 0.05$

полипептидами Р6, CspA, ScpB, ScaAB, StV, соответствующими рекомбинантным белкам Vac, CspA, ScpB (C5a-пептидаза), ScaAB и SspB1 GBS.

Иммунизированные белком Su4 мыши демонстрировали устойчивость к заражению СГВ (рис. 5). Через 45 дней от начала вакцинации мышей, иммунизированных подкожно, интравaginaльно и интраназально, инфицировали путем введения в нос СГВ 6224 в дозе 10^8 КОЕ на одно животное. В легких определяли концентрацию СГВ в динамике инфекции. Во всех иммунных группах наблюдалось ускоренное по сравнению с контролем снижение содержания бактерий. Через 3 или 24 ч после заражения наблюдали достоверные отличия или тенденцию к ускоренному выведению СГВ из ткани легких во всех исследованных группах.

СГВ представляют основную угрозу для новорожденных, матери которых страдают бессимптомной вагинальной СГВ-инфекцией. Нами была исследована эффективность вагинального пути вакцинации исследуемым белком Su4 для ограничения вагинальной формы СГВ-инфекции. С этой целью на мышах, получивших курс вагинальной иммунизации белком Su4, была смоделирована вагинальная СГВ-инфекция с последующим контролем скорости выведения бактерий.

Через 3 ч после вагинального заражения было отмечено достоверное снижение количества бактерий в смывах из вагинальной полости иммунизированных мышей по сравнению с контролем. Через 24 и 48 ч после заражения часть мышей в иммунизированной и контрольной группе полностью очистилась от инфекции, однако у носителей инфекции средний показатель инфицированности вагинальной полости

был ниже у вакцинированных мышей. В контрольной группе через 48 ч у 2 мышей этот показатель был близок к максимальному значению инфицированности, наблюдавшемуся в контроле через 3 ч после заражения (рис. 6).

Таким образом, вагинальная вакцинация мышей рекомбинантным химерным белком Su4 стимулировала иммунный ответ, который обеспечивал ускоренное по сравнению с контролем выведение СГВ из вагинальной полости мышей после вагинального заражения.

Резюмируя результаты исследований на мышах иммуногенных и протективных свойств химерного рекомбинантного белка Su4, можно заключить, что:

- рекомбинантный химерный белок Su4 иммуногенен при подкожном, интраназальном, вагинальном способах введения даже без использования адъюванта;
- все способы вакцинации приводят к индукции циркулирующих специфических IgG антител;
- максимальную иммуногенность обеспечивает подкожный способ введения;
- в пуле IgG антител, специфичных к многокомпонентному химерному белку, присутствовали антитела к антигенным детерминантам его отдельных компонентов;
- иммунный ответ, сформированный после подкожной, интраназальной и вагинальной иммунизации белком Su4, обеспечивает ускоренное очищение легких мышей от СГВ после интраназальной инфекции;
- иммунный ответ, сформированный после вагинальной иммунизации белком Su4, обеспечивает ускоренное очищение вагинальной полости мышей от СГВ после вагинальной инфекции.

Обсуждение

Streptococcus agalactiae — основная причина неонатального сепсиса и менингита. Антибиотикотерапия позволяет снизить частоту инфекций новорожденных с ранним началом, но не может оказать влияния на позднюю стадию инфицирования [10, 11, 31]. Быстрый рост антибиотикорезистентных штаммов дополнительно снижает эффективность применения антибиотиков [7–9].

Поставить под более жесткий контроль СГВ-инфекции можно с помощью специфических вакцин. В настоящее время наилучшим образом разработаны и исследованы конъюгированные полисахаридные вакцины, они ближе всего находятся к стадии лицензирования [10, 21].

Начаты клинические исследования нескольких вариантов белковых СГВ-вакцин на основе

консервативных участков ряда поверхностных белков СГВ [22]. Неоднозначность исхода клинических испытаний, стремление к выбору наиболее эффективных, инновационных и экономически выгодных форм вакцинных препаратов поддерживают интерес к продолжению поиска биологических молекул, обладающих вакцинным потенциалом [33–35].

Возможный вариант вакцинных антигенов — искусственно синтезированные мультиэпитопные рекомбинантные белки, эффективный состав которых определяют на основе анализа биоинформационных баз данных. Такие белки состоят из иммунодоминантных фрагментов актуальных бактериальных или вирусных белков, нередко в сочетании с иммунорегуляторными аминокислотными последовательностями [36].

Перед нами стояла задача исследовать протективную эффективность сконструированной нами полиэпитопной молекулы, соединяющей линейные детерминанты пяти белков СГВ — *Bac*, *CspA*, *ScpB* (C5a-пептидаза), *ScaAB* и *SspB1* и охарактеризовать особенности иммунного ответа при различных способах иммунизации. Протективная эффективность каждого из указанных белков была продемонстрирована ранее как в наших исследованиях [29, 37, 38], так и в исследованиях других авторов [40–42].

Мы показали также, что вакцинация экспериментальных мышей комплексным препаратом, состоящим из смеси пяти рекомбинантных белков СГВ, приводит к формированию системного гуморального иммунного ответа, и это коррелирует с наличием защиты от СГВ-инфекции у вакцинированных мышей [28].

С помощью программ анализа информационных баз данных BLAST (NCBI) и ExPASy в аминокислотных последовательностях белков были выбраны фрагменты, несущие консервативные иммуногенные В- и Т-клеточные линейные детерминанты. Методом химического синтеза были получены фрагменты ДНК, соответствующие каждой выбранной аминокислотной последовательности, которые были соединены в химерные ДНК-молекулы. Каждая кодировала линейные детерминанты всех пяти белков, половина была снабжена внутренним адьювантом — С-концевым участком молекулы флагеллина. Включение в структуру белка фрагмента флагеллина [43] должно было увеличить иммуногенность рекомбинантных белков, которые по ряду данных нередко обладают недостаточной иммуногенностью [44].

Мы исследовали на мышах протективную эффективность иммунного ответа к полученным вариантам полиэпитопных рекомбинантных белков (Su1–Su4) [29]. С этой целью был

использован интенсивный режим иммунизации — четырехкратное подкожное введение белков в присутствии адьюванта. Было показано, что подобный режим иммунизации приводит к синтезу и накоплению значительного количества специфических IgG в сыворотке крови, при этом иммунизированные животные демонстрируют ускоренную динамику очищения от СГВ после внутрибрюшинного заражения.

Для дальнейшего исследования был выбран один из белков Su4 с высокой степенью протективной эффективности, в состав которого не был включен внутренний адьювант-фрагмент флагеллина. Была поставлена цель — изучить его иммуногенные свойства при подкожном введении и при введении через слизистые оболочки.

Проведено сравнение иммунного ответа на белок Su4 при двукратном подкожном, интраназальном и вагинальном способе введения. При всех способах введения белок Su4 был иммуногенен и вызывал накопление специфических IgG в сыворотке крови. Как и следовало ожидать, подкожный способ иммунизации приводил к накоплению в циркуляции максимального количества антител (рис. 2). Первое однократное введение антигена Su4 через слизистые оболочки носа и вагинальной полости также достоверно стимулировало системный иммунный ответ (рис. 2). Показатели накопления специфических IgG антител после бустера не достигли уровня статистической достоверности (рис. 2, б).

Последнее может быть связано с тем, что некоторые мыши давали слабый IgG-ответ на мукозальную иммунизацию. Особенно это было заметно в группе вагинальной вакцинации. Проводя вакцинацию, мы не выравнивали фазу полового цикла у мышей исследуемых групп. Вероятно, у отдельных самок в связи с наличием слизи в вагинальной полости имелись механические препятствия для проникновения антигена через слизистую оболочку, и доза Su4 оказалась недостаточной для индукции регистрируемого системного иммунного ответа. Тем не менее на основании полученных результатов можно заключить, что белок Su4 иммуногенен при подкожном, интраназальном и вагинальном способах введения и способен стимулировать развитие специфического системного гуморального иммунного ответа.

Состав специфических IgG-антител исследован на примере сывороток, полученных после подкожной иммунизации. Системный гуморальный иммунный ответ развивался с преимущественной индукцией IgG1, что характерно для многих белков [45–47] и служит индикатором поляризации иммунного ответа по Th2-типу [48].

IgG1 способны опсонизировать бактерии, связывать комплемент [49], инициируя фагоци-

тоз бактерий — важнейший механизм защиты от бактериальной инфекции [50].

IgG-подклассы сывороток, полученных после вагинальной и интраназальной вакцинации, не изучены. Этот вопрос требует дополнительных исследований, однако можно предположить, что поляризация иммунного ответа также имеет Th2-направленность, поскольку считается, что профиль подклассов IgG-антител в значительной степени определяется природой антигена [48], а мукозальная иммунизация другими рекомбинантными белками инициирует иммунный ответ по Th2-типу [51].

Принцип создания полиэпитопных химерных молекул решает задачу получения ответа на ряд линейных иммунодоминантных эпитопов разной специфичности в результате иммунизации единой белковой молекулой [52]. Так, в наши задачи входило получение ответа на иммунодоминантные эпитопы пяти различных белков СГВ, объединенных в составе белка Su4. Очевидно, что химерная молекула кроме включенных в нее линейных детерминант может сформировать новые, в том числе пространственные детерминанты, не специфичные в отношении СГВ. Мы проанализировали качественный и количественный состав пула Su4-специфических антител с точки зрения их СГВ-специфичности. С этой целью сыворотки были проанализированы методом иммуноферментного анализа. Каждую сыворотку титровали на планшетах с сорбированными рекомбинантными полипептидами P6, CspA, ScpB, ScaAB, StV, соответствующими рекомбинантным белкам Bac, CspA, ScpB (C5a-пептидаза), ScaAB и SspB1 GBS. Мы показали, что во всех исследованных сыворотках содержались IgG, специфичные в отношении всех пяти полипептидов. Иммунизация полипептидом Su4 в наименьшей степени стимулировала иммунный ответ к полипептиду P6 (аналог белка Bac). При данном численном основании статистическая достоверность отличий, полученных анти-P6-титров в иммунных сыворотках, от аналогичного показателя в контроле составила $p = 0,26$. В целом, полученные данные, однако, свидетельствовали о том, что иммунная сыворотка содержала IgG, специфичные в отношении целевых белков СГВ.

Несмотря на значительные отличия в уровне циркулирующих антител, животные во всех трех экспериментальных группах были защищены от СГВ-инфекции после интраназального заражения. Нам удалось показать (рис. 5), что у всех вакцинированных животных скорость выведения СГВ из легких после интраназального заражения была выше, чем у контрольных мышей.

СГВ представляют наибольшую угрозу в качестве этиологических агентов инфекций новорожденных благодаря бессимптомному носительству

у женщин. Мы исследовали способность белка Su4 индуцировать защиту против вагинальной СГВ инфекции после проведенного курса вагинальной вакцинации.

Вагинальная вакцинация мышей рекомбинантным химерным белком Su4 стимулировала иммунный ответ, который обеспечивал ускоренное по сравнению с контролем выведение СГВ из вагинальной полости мышей после вагинального заражения (рис. 6). Отличия в скорости выведения были достоверными в точке 3 ч после вагинального заражения. На более поздних сроках, через 24 и 48 ч у вакцинированных мышей тенденция к ускоренному выведению СГВ сохранилась на фоне начавшегося процесса очищения от СГВ в контроле. Следует отметить, что через 48 ч только в контрольной группе у двух мышей сохранялся высокий титр СГВ в вагинальных смывах. Этот результат соответствует нашим наблюдениям (неопубликованные данные), что после вагинальной СГВ-инфекции у 20 % интактных мышей формируется продолжительное (10–14 дней) носительство СГВ.

Таким образом, мы показали, что полиэпитопный химерный рекомбинантный белок Su4 является иммуногенным при парентеральном способе вакцинации и вакцинации через слизистые оболочки респираторного и вагинального тракта мышей. Индуцированный вакцинацией иммунный ответ обеспечивает повышение устойчивости к СГВ-инфекции, что выражается в ускоренном освобождении мышей от экспериментальной интраназальной и вагинальной СГВ-инфекции по сравнению с контролем.

Следует отметить, что картина ускоренного выведения возбудителя из легких инфицированных животных во всех трех экспериментальных группах была сходной (рис. 5), несмотря на то, что титр сывороточных специфических IgG после введения антигена через слизистые оболочки респираторного и вагинального тракта был достоверно ниже такового после парентеральной вакцинации (рис. 2). Можно представить себе несколько объяснений этому феномену. Во-первых, мы не анализировали уровень секреторных IgA в бронхоальвеолярных и вагинальных смывах. Нельзя исключить, что в группе вакцинации через слизистые оболочки продукция секреторных антител была сопоставима с парентеральным путем введения или даже превосходить его, как это отмечалось в литературе [53]. Во-вторых, протективная эффективность антителопродукции определяется свойствами антител, в частности, их способностью к опсонизации и взаимодействию с рецепторами клеток иммунной системы [54–56]. Возможно, потенциал опсонизации сывороток, полученных после вагинальной и интраназальной вакцинации,

сравним с таковым для сывороток с более высоким титром после парентерального введения антигена. Этот вопрос нуждается в дополнительном исследовании.

Заключение

Изучение иммуногенности и протективной эффективности полиэпитопного рекомбинантного химерного белка Su4 позволило установить, что при подкожном, интраназальном и вагинальном способе иммунизации развивается системный IgG-ответ, специфичный в отношении белков СГВ, что повышает устойчивость вакцинированных животных к назальной и вагинальной СГВ-инфекции.

Таким образом, белок Su4 является примером конструирования перспективного мультиэпитопного варианта вакцины для защиты от инфекции, вызванной СГВ.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование было поддержано финансированием Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2022-302 от 20.04.2022.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этический комитет. Выполнение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 1/21 от 25 января 2021 г.).

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Наибольший вклад распределен следующим образом: *Г.Ф. Леонтьева* — проведение экспериментов, обработка результатов, написание текста, подбор литературы; *Т.А. Крамская* — проведение экспериментов, обсуждение и обработка результатов; *И.В. Королева*, *Е.В. Кулешевич*, *Н.В. Дуплик* — проведение экспериментов; *А.Н. Суворов* — концепция и руководство работой.

Additional information

Funding source. This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, grant number 075-15-2022-302, 20 April 2022.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval. This study received approval from the Local Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (protocol No. 1/21, dated January 25, 2021).

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Personal contribution of each author: *G.F. Leontieva*, conducting experiments, processing results, drafting the manuscript, and selecting relevant literature; *T.A. Kramskaya*, conducting experiments and discussing results; *I.V. Koroleva*, *E.V. Kuleshevich*, and *N.V. Duplic*, conducting experiments; *A.N. Suvorov*, conceptual development and project management.

Список литературы

1. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections // *Microbes Infect.* 2000. Vol. 2, N 14. P. 1733–1742. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01328-9
2. Edwards M.S., Baker C.J. Group B streptococcal infections in elderly adults // *Clin Infect Dis.* 2005. Vol. 41, N 6. P. 839–847. doi: 10.1086/432804
3. Sambola A., Miro J.M., Tornos M.P., et al. *Streptococcus agalactiae* infective endocarditis: analysis of 30 cases and review of the literature, 1962–1998 // *Clin Infect Dis.* 2002. Vol. 34, N 12. P. 1576–1584. doi: 10.1086/340538
4. Rollán M.J., San Román J.A., Vilacosta I., et al. Clinical profile of *Streptococcus agalactiae* native valve endocarditis // *Am Heart J.* 2003. Vol. 146, N 6. P. 1095–1098. doi: 10.1016/S0002-8703(03)00444-7
5. Scully B.E., Spriggs D., Neu H.C. *Streptococcus agalactiae* (group B) endocarditis – a description of twelve cases and review of the literature // *Infection.* 1987. Vol. 15, N 3. P. 169–176. doi: 10.1007/BF01646041
6. Le Doare K., Heath P.T. An overview of global GBS epidemiology // *Vaccine.* 2013. Vol. 31 Suppl 4. P. D7–12. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.009
7. Gizachew M., Tiruneh M., Moges F., Tessema B. *Streptococcus agalactiae* maternal colonization, antibiotic resistance and serotype profiles in Africa: a meta-analysis // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019. Vol. 18, N 1. P. 14. doi: 10.1186/s12941-019-0313-1
8. Wang P., Tong J.J., Ma X.H., et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, N 3. P. e0120035. doi: 10.1371/journal.pone.0120035
9. Cheng Z., Qu P., Ke P., et al. Antibiotic resistance and molecular epidemiological characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Guangzhou, South China // *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2020. Vol. 2020. P. 1368942. doi: 10.1155/2020/13689425
10. Carreras-Abad C., Ramkhalawon L., Heath P.T., Le Doare K. A vaccine against group B streptococcus: recent advances // *Infect Drug Resist.* 2020. Vol. 13. P. 1263–1272. doi: 10.2147/IDR.S203454

11. Kim S.-Y., Nguyen C., Russell L.B., et al. Cost-effectiveness of a potential group B streptococcal vaccine for pregnant women in the United States // *Vaccine*. 2017. Vol. 35, N 45. P. 6238–6247. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.085
12. Kim S.Y., Russell L.B., Park J., et al. Cost-effectiveness of a potential group B streptococcal vaccine program for pregnant women in South Africa // *Vaccine*. 2014. Vol. 32, N 17. P. 1954–1963. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.062
13. Hartley J., Li Y., Kunkel L., Crowcroft N.S. The burden of infant group B streptococcal infections in Ontario: Analysis of administrative data to estimate the potential benefits of new vaccines // *Hum Vaccin Immunother*. 2019. Vol. 15, N 1. P. 193–202. doi: 10.1080/21645515.2018.1511666
14. Baker C.J., Rench M.A., Edwards M.S., et al. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus // *N Engl J Med*. 1988. Vol. 319, N 18. P. 1180–1185. doi: 10.1056/NEJM19881033191802
15. Baker C.J., Rench M.A., Fernandez M., et al. Safety and immunogenicity of a bivalent group B streptococcal conjugate vaccine for serotypes II and III // *J Infect Dis*. 2003. Vol. 188, N 1. P. 66–73. doi: 10.1086/375536
16. Baker C.J., Rench M.A., McInnes P. Immunization of pregnant women with group B streptococcal type III capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine // *Vaccine*. 2003. Vol. 21, N 24. P. 3468–3472. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00353-0
17. Baker C.J., Paoletti L.C., Wessels M.R., et al. Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types IA and IB // *J Infect Dis*. 1999. Vol. 179, N 1. P. 142–150. doi: 10.1086/314574
18. Baker C.J., Paoletti L.C., Rench M.A., et al. Immune response of healthy women to 2 different group B streptococcal type V capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines // *J Infect Dis*. 2004. Vol. 189, N 6. P. 1103–1112. doi: 10.1086/382193
19. Heath P.T. An update on vaccination against group B streptococcus // *Expert Rev Vaccines*. 2011. Vol. 10, N 5. P. 685–694. doi: 10.1586/erv.11.61
20. Larsson C., Stålhammar-Carlén M., Lindahl G. Protection against experimental infection with group B streptococcus by immunization with a bivalent protein vaccine // *Vaccine*. 1999. Vol. 17, N 5. P. 454–458. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00218-7
21. Madhi S.A., Anderson A.S., Absalon J., et al. Potential for maternally administered vaccine for infant group B streptococcus // *N Engl J Med*. 2023. Vol. 389, N 3. P. 215–227. doi: 10.1056/NEJMoa2116045
22. Fischer P., Pawlowski A., Cao D., et al. Safety and immunogenicity of a prototype recombinant alpha-like protein subunit vaccine (GBS-NN) against Group B Streptococcus in a randomised placebo-controlled double-blind phase 1 trial in healthy adult women // *Vaccine*. 2021. Vol. 39, N 32. P. 4489–4499. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.06.046
23. Gavi.org [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.gavi.org/vaccineswork/routine-vaccines-extraordinary-impact-group-b-streptococcus-gbs>. Дата обращения: 25.12.2024.
24. Larsson C., Lindroth M., Nordin P., et al. Association between low concentrations of antibodies to protein alpha and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006. Vol. 91, N 6. P. F403–408. doi: 10.1136/adc.2005.090472
25. Santi I., Maione D., Galeotti C.L., et al. BibA induces opsonizing antibodies conferring *in vivo* protection against group B *Streptococcus* // *J Infect Dis*. 2009. Vol. 200, N 4. P. 564–570. doi: 10.1086/603540
26. Brodeur B.R., Boyer M., Charlebois I., et al. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity // *Infect Immun*. 2000. Vol. 68, N 10. P. 5610–5618. doi: 10.1128/IAI.68.10.5610-5618.2000
27. Крамская Т.А., Леонтьева Г.Ф., Грабовская К.Б., и др. Исследование защитных механизмов действия препарата поливалентной рекомбинантной вакцины на основе консервативных белков для профилактики инфекций, вызываемых стрептококками группы В // *Медицинский алфавит*. 2015. Т. 1, № 6. С. 30–33. EDN: UCMAUP
28. Felgner S., Spöring I., Pawar V., et al. The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy // *Int J Cancer*. 2020. Vol. 147, N 2. P. 448–460. doi: 10.1002/ijc.32807
29. Филимонова В.Ю., Духовлинов И.В., Крамская Т.А., и др. Химерные белки на основе иммуногенных эпитопов поверхностных факторов патогенности стрептококков в качестве вакцины для профилактики инфекции, вызванной стрептококками группы В // *Медицинский академический журнал*. 2016. Т. 16, № 3. С. 82–90. EDN: XDNAAZ
30. Suvorov A., Dukhovlinov I., Leontieva G., et al. Chimeric Protein PSPF, a potential vaccine for prevention streptococcus pneumonia infection // *Vaccines and Vaccination*. 2015. Vol. 2015, N 6. P. 1–8. doi: 10.172/2157-7560.10000304
31. Majumder K. Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin // *Gene*. 1992. Vol. 110, N 1. P. 89–94. doi: 10.1016/0378-1119(92)90448-x Erratum in: *Gene*. 1992. Vol. 116, N 1. P. 115–116. doi: 10.1016/0378-1119(92)90638-6 Erratum in: *Gene*. 1992. Vol. 122, N 2. P. 389.
32. Dzanibe S., Kwatra G., Adrian P.V., et al. Association between antibodies against group B Streptococcus surface proteins and recto-vaginal colonisation during pregnancy // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, N 1. P. 16454. doi: 10.1038/s41598-017-16757-9
33. Procter S.R., Gonçalves B.P., Paul P., et al. Maternal immunisation against Group B Streptococcus: A global analysis of health impact and cost-effectiveness // *PLoS Med*. 2023. Vol. 20, N 3. P. e1004068. doi: 10.1371/journal.pmed.1004068
34. Gupalova T., Leontieva G., Kramskaya T., et al. Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, N 5. P. e0196564. doi: 10.1371/journal.pone.0196564
35. Furfaro L.L., Chang B.J., Payne M.S. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets // *Clin Microbiol Rev*. 2018. Vol. 31, N 4. P. e00049–18. doi: 10.1128/CMR.00049-18
36. Bambini S., Rappuoli R. The use of genomics in microbial vaccine development // *Drug Discov Today*. 2009. Vol. 14, N 5–6. P. 252–260. doi: 10.1016/j.drudis.2008.12.007
37. Suvorov A., Ustinovitch I., Meringova L., et al. Construction of recombinant polypeptides based on beta antigen C (Bac) protein and their usage for protection against group B streptococcal infection // *Indian J Med Res*. 2004. Vol. 119 Suppl. P. 228–232.
38. Vorobieva E.I., Meringova L.F., Leontieva G.F., et al. Analysis of recombinant group B streptococcal protein ScaAB and evalu-

- ation of its immunogenicity // *Folia Microbiol (Praha)*. 2005. Vol. 50, N 2. P. 172–176. doi: 10.1007/BF02931468
39. Schrag S.J., Zywicki S., Farley M.M., et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis // *N Engl J Med*. 2000. Vol. 342, N 1. P. 15–20. doi: 10.1056/NEJM20001063420103
 40. Michel J.L., Madoff L.C., Kling D.E., et al. Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity // *Infect Immun*. 1991. Vol. 59, N 6. P. 2023–2028. doi: 10.1128/iai.59.6.2023-2028.1991
 41. Navarre W.W., Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope // *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999. Vol. 63, N 1. P. 174–229. doi: 10.1128/MMBR.63.1.174-229.1999
 42. Santillan D.A., Rai K.K., Santillan M.K., et al. Efficacy of polymeric encapsulated C5a peptidase-based group B streptococcus vaccines in a murine model // *Am J Obstet Gynecol*. 2011. Vol. 205, N 3. P. 249.e1–8. doi: 10.1016/j.ajog.2011.06.024
 43. Hajam I.A., Dar P.A., Shah Nawaz I., et al. Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent // *Exp Mol Med*. 2017. Vol. 49, N 9. P. e373. doi: 10.1038/emm.2017.172
 44. Scheiblhofer S., Laimer J., Machado Y., et al. Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design // *Expert Rev Vaccines*. 2017. Vol. 16, N 5. P. 479–489. doi: 10.1080/14760584.2017.1306441
 45. Toellner K.M., Luther S.A., Sze D.M., et al. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching // *J Exp Med*. 1998. Vol. 187, N 8. P. 1193–1204. doi: 10.1084/jem.187.8.1193
 46. Urban J.F. Jr., Noben-Trauth N., Donaldson D.D., et al. IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis* // *Immunity*. 1998. Vol. 8, N 2. P. 255–264. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80477-x
 47. Cunningham A.F., Khan M., Ball J., et al. Responses to the soluble flagellar protein FlhC are Th2, while those to FlhC on *Salmonella* are Th1 // *Eur J Immunol*. 2004. Vol. 34, N 11. P. 2986–2995. doi: 10.1002/eji.200425403
 48. Bretscher P.A. On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases // *Scand J Immunol*. 2014. Vol. 79, N 6. P. 361–376. doi: 10.1111/sji.12175
 49. Wang G., de Jong R.N., van den Bremer E.T., et al. Molecular basis of assembly and activation of complement component C1 in complex with immunoglobulin G1 and antigen // *Mol Cell*. 2016. Vol. 63. P. 135–145. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.016
 50. Cheng Q., Carlson B., Pillai S., et al. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci // *Infect Immun*. 2001. Vol. 69, N 4. P. 2302–2308. doi: 10.1128/IAI.69.4.2302-2308.2001
 51. Arlian B.M., Tinker J.K. Mucosal immunization with a *Staphylococcus aureus* IsdA-cholera toxin A2/B chimera induces antigen-specific Th2-type responses in mice // *Clin Vaccine Immunol*. 2011. Vol. 18, N 9. P. 1543–1551. doi: 10.1128/CI.05146-11
 52. Zhang L. Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections // *Cell Mol Immunol*. 2018. Vol. 15, N 2. P. 182–184. doi: 10.1038/cmi.2017.92
 53. Ma C., Li Y., Wang L., et al. Intranasal vaccination with recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein induces much stronger local mucosal immune responses than subcutaneous immunization: Implication for designing novel mucosal MERS vaccines // *Vaccine*. 2014. Vol. 32, N 18. P. 2100–2108. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.004
 54. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding // *Science*. 2005. Vol. 310. P. 1510–1512. doi: 10.1126/science.1118948
 55. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fc gamma receptors as regulators of immune responses // *Nat Rev Immunol*. 2008. Vol. 8. P. 34–47. doi: 10.1038/nri2206
 56. Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions // *Front Immunol*. 2014. Vol. 5. P. 520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520

References

1. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect*. 2000;2(14):1733–1742. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01328-9
2. Edwards MS, Baker CJ. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis*. 2005;41(6):839–847. doi: 10.1086/432804
3. Sambola A, Miro JM, Tornos MP, et al. *Streptococcus agalactiae* infective endocarditis: analysis of 30 cases and review of the literature, 1962–1998. *Clin Infect Dis*. 2002;34(12):1576–1584. doi: 10.1086/340538
4. Rollán MJ, San Román JA, Vilacosta I, et al. Clinical profile of *Streptococcus agalactiae* native valve endocarditis. *Am Heart J*. 2003;146(6):1095–1098. doi: 10.1016/S0002-8703(03)00444-7
5. Scully BE, Spriggs D, Neu HC. *Streptococcus agalactiae* (group B) endocarditis – a description of twelve cases and review of the literature. *Infection*. 1987;15(3):169–176. doi: 10.1007/BF01646041
6. Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*. 2013;31 Suppl 4:D7–12. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.009
7. Gizachew M, Tiruneh M, Moges F, Tessema B. *Streptococcus agalactiae* maternal colonization, antibiotic resistance and serotype profiles in Africa: a meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2019;18(1):14. doi: 10.1186/s12941-019-0313-1
8. Wang P, Tong JJ, Ma XH, et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120035. doi: 10.1371/journal.pone.0120035
9. Cheng Z, Qu P, Ke P, et al. Antibiotic resistance and molecular epidemiological characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Guangzhou, South China. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020;2020:1368942. doi: 10.1155/2020/13689425
10. Carreras-Abad C, Ramkhalawon L, Heath PT, Le Doare K. A vaccine against group B streptococcus: recent advances. *Infect Drug Resist*. 2020;13:1263–1272. doi: 10.2147/IDR.S203454
11. Kim S-Y, Nguyen C, Russell LB, et al. Cost-effectiveness of a potential group B streptococcal vaccine for pregnant women in the United States. *Vaccine*. 2017;35(45):6238–6247. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.085
12. Kim SY, Russell LB, Park J, et al. Cost-effectiveness of a potential group B streptococcal vaccine program for preg-

- nant women in South Africa. *Vaccine*. 2014;32(17):1954–1963. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.062
13. Hartley J, Li Y, Kunkel L, Crowcroft NS. The burden of infant group B streptococcal infections in Ontario: Analysis of administrative data to estimate the potential benefits of new vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(1):193–202. doi: 10.1080/21645515.2018.1511666
 14. Baker CJ, Rench MA, Edwards MS, et al. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. *N Engl J Med*. 1988;319(18):1180–1185. doi: 10.1056/NEJM198811033191802
 15. Baker CJ, Rench MA, Fernandez M, et al. Safety and immunogenicity of a bivalent group B streptococcal conjugate vaccine for serotypes II and III. *J Infect Dis*. 2003;188(1):66–73. doi: 10.1086/375536
 16. Baker CJ, Rench MA, McInnes P. Immunization of pregnant women with group B streptococcal type III capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Vaccine*. 2003;21(24):3468–3472. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00353-0
 17. Baker CJ, Paoletti LC, Wessels MR, et al. Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types IA and IB. *J Infect Dis*. 1999;179(1):142–150. doi: 10.1086/314574
 18. Baker CJ, Paoletti LC, Rench MA, et al. Immune response of healthy women to 2 different group B streptococcal type V capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *J Infect Dis*. 2004;189(6):1103–1112. doi: 10.1086/382193
 19. Heath PT. An update on vaccination against group B streptococcus. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(5):685–694. doi: 10.1586/erv.11.61
 20. Larsson C, Ståhlhammar-Carlén M, Lindahl G. Protection against experimental infection with group B streptococcus by immunization with a bivalent protein vaccine. *Vaccine*. 1999;17(5):454–458. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00218-7
 21. Madhi SA, Anderson AS, Absalon J, et al. Potential for maternally administered vaccine for infant group B streptococcus. *N Engl J Med*. 2023;389(3):215–227. doi: 10.1056/NEJMoa2116045
 22. Fischer P, Pawlowski A, Cao D, et al. Safety and immunogenicity of a prototype recombinant alpha-like protein subunit vaccine (GBS-NN) against Group B Streptococcus in a randomised placebo-controlled double-blind phase 1 trial in healthy adult women. *Vaccine*. 2021;39(32):4489–4499. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.06.046
 23. Gavi.org [Internet]. Available from: <https://www.gavi.org/vaccineswork/routine-vaccines-extraordinary-impact-group-b-streptococcus-gbs>. Accessed: 2024 Dec 25.
 24. Larsson C, Lindroth M, Nordin P, et al. Association between low concentrations of antibodies to protein alpha and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006;91(6):F403–408. doi: 10.1136/adc.2005.090472
 25. Santi I, Maione D, Galeotti CL, et al. BibA induces opsonizing antibodies conferring *in vivo* protection against group B *Streptococcus*. *J Infect Dis*. 2009;200(4):564–570. doi: 10.1086/603540
 26. Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, et al. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect Immun*. 2000;68(10):5610–5618. doi: 10.1128/IAI.68.10.5610-5618.2000
 27. Kramskaya TA, Leontyeva GF, Grabovskaya KB, et al. Study of the protective mechanisms of action of a polyvalent recombinant vaccine based on conservative proteins for the prevention of infections caused by group B streptococci. *Medical alphabet*. 2015;1(6):30–33. (In Russ.) EDN: UCMAUP
 28. Felgner S, Spöring I, Pawar V, et al. The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy. *Int J Cancer*. 2020;147(2):448–460. doi: 10.1002/ijc.32807
 29. Filimonova VYu, Dukhovlinov IV, Kramskaya TA, et al. Chimeric proteins based on immunogenic epitopes of surface pathogenicity factors of streptococci as a vaccine for the prevention of infection caused by group B streptococci. *Medical Academic Journal*. 2016;16(3):82–90. EDN: XDNAAZ
 30. Suvorov A, Dukhovlinov I, Leontieva G, et al. Chimeric Protein PSPF, a potential vaccine for prevention streptococcus pneumonia infection. *Vaccines and Vaccination*. 2015;2015(6):1–8. doi: 10.1047/2157-7560.10000304
 31. Majumder K. Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene*. 1992;110(1):89–94. doi: 10.1016/0378-1119(92)90448-x Erratum in: *Gene*. 1992;116(1):115–116. doi: 10.1016/0378-1119(92)90638-6 Erratum in: *Gene*. 1992;122(2):389.
 32. Dzanibe S, Kwatra G, Adrian PV, et al. Association between antibodies against group B Streptococcus surface proteins and recto-vaginal colonisation during pregnancy. *Sci Rep*. 2017;7(1):16454. doi: 10.1038/s41598-017-16757-9
 33. Procter SR, Gonçalves BP, Paul P, et al. Maternal immunisation against Group B Streptococcus: A global analysis of health impact and cost-effectiveness. *PLoS Med*. 2023;20(3):e1004068. doi: 10.1371/journal.pmed.1004068
 34. Gupalova T, Leontieva G, Kramskaya T, et al. Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization. *PloS One*. 2018;13(5):e0196564. doi: 10.1371/journal.pone.0196564
 35. Furfaro LL, Chang BJ, Payne MS. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00049–18. doi: 10.1128/CMR.00049-18
 36. Bambini S, Rappuoli R. The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug Discov Today*. 2009;14(5–6):252–260. doi: 10.1016/j.drudis.2008.12.007
 37. Suvorov A, Ustinovitch I, Meringova L, et al. Construction of recombinant polypeptides based on beta antigen C (Bac) protein & their usage for protection against group B streptococcal infection. *Indian J Med Res*. 2004;119 Suppl:228–232.
 38. Vorobieva EI, Meringova LF, Leontieva GF, et al. Analysis of recombinant group B streptococcal protein ScaAB and evaluation of its immunogenicity. *Folia Microbiol (Praha)*. 2005;50(2):172–176. doi: 10.1007/BF02931468
 39. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med*. 2000;342(1):15–20. doi: 10.1056/NEJM200001063420103
 40. Michel JL, Madoff LC, Kling DE, et al. Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity. *Infect Immun*. 1991;59(6):2023–2028. doi: 10.1128/iai.59.6.2023-2028.1991
 41. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63(1):174–229. doi: 10.1128/MMBR.63.1.174-229.1999

42. Santillan DA, Rai KK, Santillan MK, et al. Efficacy of polymeric encapsulated C5a peptidase-based group B streptococcus vaccines in a murine model. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(3):249.e1–8. doi: 10.1016/j.ajog.2011.06.024
43. Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, et al. Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med.* 2017;49(9):e373. doi: 10.1038/emmm.2017.172
44. Scheibelhofer S, Laimer J, Machado Y, et al. Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(5):479–489. doi: 10.1080/14760584.2017.1306441
45. Toellner KM, Luther SA, Sze DM, et al. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med.* 1998;187(8):1193–1204. doi: 10.1084/jem.187.8.1193
46. Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, et al. IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity.* 1998;8(2):255–264. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80477-x
47. Cunningham AF, Khan M, Ball J, et al. Responses to the soluble flagellar protein FlhC are Th2, while those to FlhC on *Salmonella* are Th1. *Eur J Immunol.* 2004;34(11):2986–2995. doi: 10.1002/eji.200425403
48. Bretscher PA. On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases. *Scand J Immunol.* 2014;79(6):361–376. doi: 10.1111/sji.12175
49. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ET, et al. Molecular basis of assembly and activation of complement component C1 in complex with immunoglobulin G1 and antigen. *Mol Cell.* 2016;63:135–145. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.016
50. Cheng Q, Carlson B, Pillai S, et al. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect Immun.* 2001;69(4):2302–2308. doi: 10.1128/IAI.69.4.2302-2308.2001
51. Arlian BM, Tinker JK. Mucosal immunization with a *Staphylococcus aureus* IspA–cholera toxin A2/B chimera induces antigen-specific Th2-type responses in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(9):1543–1551. doi: 10.1128/CI.05146-11
52. Zhang L. Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(2):182–184. doi: 10.1038/cmi.2017.92
53. Ma C, Li Y, Wang L, et al. Intranasal vaccination with recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein induces much stronger local mucosal immune responses than subcutaneous immunization: Implication for designing novel mucosal MERS vaccines. *Vaccine.* 2014;32(18):2100–2108. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.004
54. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science.* 2005;310:1510–1512. doi: 10.1126/science.1118948
55. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:34–47. doi: 10.1038/nri2206
56. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Галина Федоровна Леонтьева — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии.

ORCID: 0000-0002-9876-6594;
eLibrary SPIN: 5204-9252;
e-mail: galeonte@Yandex.ru

Татьяна Анатольевна Крамская — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии.

ORCID: 0000-0002-9408-6647;
eLibrary SPIN: 4529-3260;
e-mail: Tatyana.kramskaya@gmail.com

Ирина Владимировна Королева — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии.

ORCID: 0000-0002-7966-5130;
eLibrary SPIN: 6456-7406;
e-mail: IVKoroleva@Yandex.ru

Евгения Владимировна Кулешевич — канд. биол. наук, научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии.

eLibrary SPIN: 6514-2213;
e-mail: k-zh-v@mail.ru

Galina F. Leontieva, Cand. Sci. (Biology),
Leading Research Associate
of Department of Molecular Microbiology.
ORCID: 0000-0002-9876-6594;
eLibrary SPIN: 5204-9252;
e-mail: galeonte@Yandex.ru

Tatyana A. Kramskaya, Cand. Sci. (Biology),
Senior Research Associate
of Department of Molecular Microbiology.
ORCID: 0000-0002-9408-6647;
eLibrary SPIN: 4529-3260;
e-mail: Tatyana.kramskaya@gmail.com

Irina V. Koroleva, Cand. Sci. (Biology),
Senior Research Associate
of Department of Molecular Microbiology.
ORCID: 0000-0002-7966-5130;
eLibrary SPIN: 6456-7406;
e-mail: IVKoroleva@Yandex.ru

Evgenia V. Kuleshevich, Cand. Sci. (Biology),
Research Associate of Department of Molecular
Microbiology.
eLibrary SPIN: 6514-2213;
e-mail: k-zh-v@mail.ru

Информация об авторах / Information about the authors

Надежда Владиленовна Дуплик —
канд. биол. наук, научный сотрудник отдела
молекулярной микробиологии.
ORCID: 0000-0001-6595-7354;
eLibrary SPIN: 6628-3532;
e-mail: nadezhdaduplik@gmail.com

Александр Николаевич Суворов — д-р мед. наук,
профессор, чл.-корр. РАН, руководитель отдела
молекулярной микробиологии.
ORCID: 0000-0003-2312-5589;
eLibrary SPIN: 8062-5281;
e-mail: alexander_suvorov1@hotmail.com

Nadezhda V. Duplik, Cand. Sci. (Biology),
Research Associate of Department of Molecular
Microbiology.
ORCID: 0000-0001-6595-7354;
eLibrary SPIN: 6628-3532;
e-mail: nadezhdaduplik@gmail.com

Alexander N. Suvorov, MD, Dr. Sci. (Medicine),
Professor, Corresponding Member RAS,
Head of Department of Molecular Microbiology.
ORCID: 0000-0003-2312-5589;
eLibrary SPIN: 8062-5281;
e-mail: alexander_suvorov1@hotmail.com

 Контактное лицо / Corresponding author

Татьяна Анатольевна Крамская / *Tatiana A. Kramskaya*
Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia
E-mail: Tatyana.kramskaya@gmail.com