



УДК 612.017.12:579.862.1:57.083.3

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Streptococcus pneumoniae* И ИММУНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОКОНЪЮГАТОВ

© 2021 г. М. Л. Генинг*, Е. А. Курбатова**, Н. Э. Нифантьев*.,#

*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский проспект, 47

**НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а

Поступила в редакцию 30.07.2020 г.

После доработки 14.08.2020 г.

Принята к публикации 15.08.2020 г.

Грамположительные бактерии *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) вызывают тяжелые заболевания у взрослых и детей. Установлено, что некоторые капсулярные полисахариды клинически значимых серотипов *S. pneumoniae* в составе коммерческих полисахаридных и конъюгированных пневмококковых вакцин обладают низкой иммуногенностью. В обзоре рассмотрены методы получения и структурные особенности синтетических олигосахаридов “проблемных” серотипов пневмококка, характеризующихся низкой иммуногенностью вследствие деструкции или нежелательной модификации в процессе их выделения и очистки; серотипов, вызывающих тяжелые пневмококковые заболевания, а также серотипов, не входящих в состав конъюгированных пневмококковых вакцин. Показано, что синтетические олигосахариды, соответствующие протективным гликотопам капсулярных полисахаридов различных серотипов *S. pneumoniae*, индуцируют образование протективных опсонизирующих антител и формирование иммунологической памяти. Представлены оптимальные конструкции олигосахаридов эпидемиологически значимых серотипов *S. pneumoniae*, которые могут быть использованы для создания синтетических пневмококковых вакцин и диагностических тест-систем для обнаружения заражений *S. pneumoniae*, а также контроля эффективности вакцинации.

Ключевые слова: пневмококки, вакцина, олигосахарид, лиганд, иммуноген, антитела, опсонофагоцитоз, протективная активность

DOI: 10.31857/S0132342321010073

ВВЕДЕНИЕ

Грамположительные бактерии *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) вызывают тяжелые инвазивные и неинвазивные заболевания у детей и взрослых и способны персистировать на слизистой оболочке носоглотки здоровых носителей, не вызывая клинических проявлений инфекции. Большая часть штаммов пневмококка окружена полисахаридной капсулой. На основе структурно раз-

личающихся между собой капсулярных полисахаридов (КП), экспрессируемых *S. pneumoniae*, идентифицировано более 90 серотипов пневмококка [1–3].

По критерию тяжести течения пневмококковой инфекции можно разделить на инвазивные и неинвазивные. К инвазивным пневмококковым инфекциям традиционно относят бактериемию, менингит, пневмонию и другие патологические состояния, при которых возбудитель выделяют из обычно стерильных органов и тканей (кровь, цереброспинальная жидкость, реже – синовиальная, плевральная и перикардиальная жидкости). Среди неинвазивных форм болезни выделяют инфекции верхних дыхательных путей (средний отит, параназальный синусит), нижних дыхательных путей (бронхит), а также другие относительно редко регистрируемые инфекции (конъюнктивит, перитонит, артрит, полиартрит и др.). Инвазивные пневмококковые заболевания могут завершаться летально, особенно у детей младшего возраста, пожилых людей и иммунокомпрометированных лиц [4, 5]. Тяжесть течения пневмококковой ин-

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin); CD – антиген кластеров дифференцировки клеток; CRM197 – нетоксичная форма рекомбинантного дифтерийного анатоксина (белок-носитель); D-AAT – 2-ацетамидо-4-амино-2,4,6-тридеокси-D-галактоза; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IFN γ – интерферон гамма; IL – интерлейкин; KLH – гемоцианин лимфы улитки; mAb – моноклональные антитела; MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; NK – натуральные киллеры; TLR – Toll-подобный рецептор; TNF α – фактор некроза опухоли альфа; КП – капсулярный полисахарид.

Автор для связи: (тел./факс: +7 (499) 135-87-84; эл. почта: nep@ioc.ac.ru).

фекции зависит от серотипа *S. pneumoniae* [6–11]. Так, *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 19А, 19F и 23F имеют хорошо развитую капсулу, относятся к серотипам с низкой инвазивной активностью и вызывают заболевания, ассоциированные с высоким риском летального исхода, преимущественно у иммунокомпрометированных лиц. Серотипы 1, 7F, 4, 9N, 9V и 14 со средним или высоким инвазивным потенциалом и тонкой капсулой наиболее часто вызывают заболевания у здоровых лиц, действуя как первичные патогены [12, 13].

Эпидемиология *S. pneumoniae*. Частота распространения различных серотипов пневмококка зависит от локализации инфекции, географического местоположения, возраста [6]. Серотипы пневмококка значительно различаются по вирулентности [6, 7, 14–17]. По данным ВОЗ, в 2007 г. ~80–90% всех пневмококковых заболеваний вызывали 20 серотипов *S. pneumoniae* [18, 19].

В ряде публикаций приведены данные о распространении различных серотипов пневмококка в США, Азии, Африке, Европе, Латинской Америке, Австралии, Новой Зеландии, Беларуси, Украине и России в разные годы среди детей и взрослых [20–28]. В 2012 г. проведено масштабное эпидемиологическое исследование в шести странах Юго-Восточной Азии по изучению распространности различных серотипов *S. pneumoniae*. Наиболее часто выделяли серотипы 1, 3, 6В, 14, 19А, 19F и 23F. Существенных различий в доминировании того или иного серотипа в зависимости от региона не выявлено [29].

Показано, что из крови пациентов выделяли преимущественно серотипы 1 и 14, из цереброспинальной жидкости – серотипы 6, 10 и 23, из отделяемого среднего уха детей – серотипы 3, 19 и 23 [8]. Серотипы 6А, 6В, 14, 19F и 23 рассматривают как основные “педиатрические” штаммы пневмококка [4, 30]. В США у детей младшего возраста 80% менингитов вызывали серотипы 14, 6В, 19F, 18С, 23F и 9V, а у детей старше 6 лет на их долю приходилось лишь 50% всех изолятов [6, 31–34].

В Японии с 2011 по 2013 гг. у взрослых с заболеваниями респираторного тракта обнаруживали серотипы 3, 4, 19F и 23F [35]. В двух других исследованиях, проведенных в этом же географическом регионе, доминировал серотип 3 [36, 37]. В 2014–2016 гг. на юго-востоке Аравийского полуострова при инвазивных пневмококковых заболеваниях преобладали серотипы 3, 12, 15, 19А и 19F [38].

В Корее и Испании наиболее часто выявляли штаммы серотипов 3, 6, 11, 19 и 23 [39, 40]. В другом исследовании показано, что в Испании с 2001–2014 гг. преобладали серотипы 1, 3, 7F и 19А. Чаще всего у пациентов с осложнениями, развившимися в период пребывания в стационаре, выявляли *S. pneumoniae* серотипа 3. Наиболее часто из серотипов, не входящих в состав вакци-

ны Pnevnar 13® (Pfizer), выявляли серотип 22F. Показано, что значительная часть взрослых, вакцинированных в детстве против пневмококка, болела внебольничной пневмонией, вызванной серотипами, входящими в состав вакцин, которыми они были привиты в детском возрасте. Это определяет необходимость разработки стратегии вакцинации для снижения заболеваемости у взрослых [41]. В США причиной среднего отита чаще всего были серотипы 3, 6, 14, 18, 19 и 23 [30, 42].

При оценке распространенности различных серотипов пневмококка на территории России у детей при носительстве доминировали серотипы 3, 6, 9, 14, 19, 23, в меньшей степени – серотипы 7 и 18 [21]. При остром среднем отите с наибольшей частотой обнаруживали серотип 19, реже серотипы 3, 4, 6, 8, 9, 14, 15, 20, 22 и 23. Преобладающими у детей с внебольничной пневмонией были серотипы 19, в меньшей степени – серотипы 6, 14 и 23; при инвазивной пневмококковой инфекции – серотипы 5 и 1, выделенные из ткани легкого. Преобладающими серотипами, вызывающими инвазивные инфекции, были 8, 19 в заметно меньшей степени, 1, 5 и 23. Распространение серотипов 3, 6, 15 и 19 среди детей с пневмококковыми инфекциями также было отмечено и в других исследованиях [43]. Штаммы были чувствительны к пенициллину, за исключением всех штаммов, относящихся к серотипу 19 [21]. Это согласуется с данными других авторов, которые свидетельствуют о том, что современные штаммы *S. pneumoniae* чувствительны к пенициллину, но устойчивы к макролидам (эритромицин) [38].

Сведения о серотиповом пейзаже пневмококков в Москве ограничены. В Москве в 2000–2007 гг. среди штаммов пневмококка, полученных от больных пневмококковым менингитом, во всех возрастных категориях доминировали серотипы 3, 6 и 19. Ведущими серотипами на территории Москвы являлись серотипы 1, 3, 4, 6В, 6А, 7F, 15А, 15В, 18С и 19F, на долю которых приходилось 63% исследованных штаммов. Сравнение серотипового пейзажа возбудителей, выделенных в 1980–1999 гг., со штаммами 2000–2012 гг. показало различие структуры и долевого участия доминирующих серотипов. Если среди штаммов 1980–1999 гг. преобладающими серотипами (в порядке уменьшения значимости) были 1, 3, 19F, 6А, 7F, 12F, 18С и 19А, то среди культур 2000–2012 гг. доминировали серотипы 3, 19F, 6В, 7F, 15А, 15В, 1, 4 и 6А [44].

Таким образом, сегодня в мире наибольшее клиническое значение имеют серотипы **1, 2, 3, 4, 5, 6А/В, 7F, 8, 9, 11, 12, 14, 15А/В, 18С, 19А/В, 20, 22 и 23F**, в России – серотипы **1, 3, 4, 6А/В, 7F, 12, 14, 15А/В, 18С и 19F** (серотипы, выделенные жирным шрифтом, встречаются с наибольшей частотой). Очевидно, что этот набор штаммов может со временем изменяться, в том числе расширяться

из-за увеличения эпидемиологической значимости других серотипов пневмококков.

Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции. Успех вакцинопрофилактики инфекций, вызываемых *S. pneumoniae*, во многом зависит от степени соответствия серотипного состава вакцины спектру циркулирующих штаммов пневмококка в регионе применения вакцины. В контролируемом испытании 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины у детей уровни сывороточных антител ко всем серотипам, входящим в состав вакцины, увеличивались после иммунизации во всех возрастных группах. Образование антител, индуцированных к КП серотипов 6А, 14, 19F и 23F, было слабым у детей до 4.5 лет [45].

При проведении первой фазы клинических испытаний 20-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины, содержащей семь новых серотипов пневмококка (8, 10А, 11А, 12F, 15В, 22F и 33F) и предназначенной для расширения спектра действия уже существующих конъюгированных вакцин (Pneumovax 7[®], Synflorix[®] (GSK) и Pnevnaq 13[®]), отмечено повышение опсонофагocитарной активности и концентрации IgG-антител к КП всех серотипов пневмококка, входящих в состав соответствующей вакцины [46].

При проведении клинических испытаний у детей 10-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины Synflorix[®] (зарегистрирована в России), содержащей в своем составе КП *S. pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, каждый из которых был индивидуально конъюгирован с протеином D, выделенным из *Haemophilus influenzae*, существенно повышалась концентрация IgG-антител к КП серотипов, входящих в состав вакцины [47]. Вакцинация способствовала уменьшению количества эпизодов инфекции, вызванных вакцинными штаммами, но существенно не влияла на возникновение заболеваний, вызванных невакцинными 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, за исключением серотипа 3, установлен существенный защитный эффект вакцинации, который варьировал от минимального (в отношении серотипа 19F – 44.4%) до максимального (в отношении серотипа 14 – 95.5%). Что касается серотипа 3, то общее количество эпизодов острого среднего отита в группе, получавшей пневмококковую вакцину, и в контрольной группе составило 20 и 17 соответственно [48]. Отмечено повышение титров антител к КП пневмококка и их опсонизирующей активности [49]. Показано, что в предупреждении острого среднего отита ключевое значение имеют антитела IgG с высокой опсонофаго-

цитарной активностью, тогда как титр антител не является достаточно информативным показателем [50]. Shiramoto et al. показали, что иммуногенность вакцин Pnevnaq 13[®] и Pneumovax[®] 23 (Merck) у лиц пожилого возраста, которую оценивали по титру антител и их опсонофагocитарной активности, была ниже для КП серотипа 3 по сравнению с другими серотипами пневмококка, причем при введении обеих исследованных вакцин [51]. При иммунизации полисахаридной пневмококковой вакциной не наблюдалось 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 повышался [52]. На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что иммуногенность КП различных серотипов пневмококка неодинакова [53].

СТРОЕНИЕ КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *S. pneumoniae* И СИНТЕЗ РОДСТВЕННЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН

Разрешенные сегодня к применению пневмококковые вакцины производят при использовании бактериальных КП актуальных серотипов пневмококка или конъюгируют КП с белком-носителем с последующим добавлением адьюванта. КП выделяют из культуральной среды после инактивации патогена [54]. Недостатком традиционных вакцин на основе КП пневмококка является необходимость работы с микробной культурой вирулентных штаммов пневмококка. Очистка КП от бактериальных примесей является весьма трудоемкой, а конъюгация с белком-носителем, необходимая для индукции Т-зависимого иммунного ответа с образованием опсонизирующих IgG-антител и иммунологической памяти – не всегда успешной. Выделенный из культуральной среды КП, даже после проведения очистки, содержит примесь антигенов бактериальной клетки, таких как полисахарид клеточной стенки (тейхоевая кислота или С-полисахарид), нуклеиновые кислоты и др. В результате получают продукт, который химически неоднороден, что может служить препятствием при последующей его конъюгации с белком-носителем [54, 55].

Бактериальные КП состоят из повторяющихся олигосахаридных звеньев различной длины [56], состоящих в случае *S. pneumoniae*, например, из двух (серотип 3) или восьми (серотип 17А) моносахаридных остатков [57]. Антитела, индуцированные к одному эпиптопу КП, могут быть протективными, а к другому – нет. Низкая эффективность КП может быть связана в ряде случаев с индивидуальными особенностями отдельных КП, в том числе с возможными различиями конфор-

мационных характеристик КП в составе бактериальной капсулы и в составе вакцины. Это, в свою очередь, может приводить к различию эпитопной специфичности антител, индуцируемых пневмококком и вакциной.

Эпитопы КП *S. pneumoniae* могут быть представлены на синтетических олигосахаридах [30], которые также конъюгируют с белком-носителем традиционными химическими методами для получения полусинтетической вакцины. В настоящее время синтезированы олигосахариды для серотипов 1–4, 6A/B, 7F, 8, 9A/V, 12, 14, 17F, 18C, 19A/F, 22F, 23F, 27 и 29 [58, 59]. Для получения олигосахаридов, содержащих несколько повторяющихся единиц, соответствующих структуре КП, используют методы гидролиза КП, химический синтез и биосинтез [58, 59]. Некоторые олигосахариды успешно получены путем гидролиза. Недостатком этого метода являются трудности контролируемого получения олигосахаридов с точки зрения химической структуры, длины олигосахарида и присутствия бактериальных примесей. Химический синтез нескольких повторяющихся звеньев олигосахарида стал доступным, но он достаточно сложный и требует проведения большого количества стадий синтеза. Комбинация химического синтеза и биосинтеза является альтернативным методом, который позволяет получать большие количества олигосахаридов с большой длиной цепи. Информация о биосинтезе синтетических аналогов КП серотипов 3, 14 и 19F известна [58].

Иммунный ответ на олигосахариды является высокоспецифичным. Интересно, что некоторые олигосахариды, конъюгированные с белком-носителем, индуцируют даже более высокий титр антител к КП, чем соответствующие конъюгаты КП [60]. Идентификация иммуногенных гликотопов КП *S. pneumoniae*, обеспечивающих протективные свойства гликоконъюгатных пневмококковых вакцин, является способом повышения их эффективности. Использование коротких олигосахаридов, полученных путем химического синтеза, дает лучшую, чем в случае крупных олигосахаридов или полисахаридов, возможность провести контролируемую конъюгацию и оценить иммуногенность вакцин при варьировании их специфических структурных параметров, например, длины олигосахаридного фрагмента и соотношения углеводов/белок [61]. Таким образом, синтетические олигосахариды являются привлекательной альтернативной гетерогенным препаратам очищенных бактериальных КП, на основе которых получены первые коммерческие пневмококковые вакцины [62, 63]. Иммуногенные свойства гликоконъюгатов могут быть оптимизированы за счет использования синтетических антигенных структур, способных вызывать образование протективных антител [52].

В 2015 г. нами был опубликован обзор, посвященный подходам к созданию пневмококковых вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов, относящихся к углеводным вакцинам третьего поколения [55]. В последние годы работы в данном направлении активно развиваются, и в настоящем обзоре мы рассматриваем все серотипы пневмококка, для которых получены синтетические фрагменты КП и проводятся иммунологические исследования с их участием. Особое внимание уделено наиболее “проблемным” КП некоторых актуальных серотипов пневмококка с большим акцентом на исследования последних лет.

***S. pneumoniae* серотипа 1.** КП высокоинвазивного серотипа 1 имеет особое химическое строение и содержит редкий моносахарид – 2-ацетиламино-4-амино-2,4,6-тридеокси-D-галактозу (D-ААТ) (1) [64] (рис. 1). Отмечают, что КП серотипа 1 в составе пневмококковых вакцин является недостаточно эффективным [65]. Показано, что коммерческая гликоконъюгатная вакцина Prevnar 13® индуцирует низкий уровень функциональных антител к КП серотипа 1 (1) вследствие возможной модификации протективных эпитопов КП (в частности, аминокрупп) в процессе химической активации и конъюгации с белком-носителем. При химической обработке КП серотипа 1 (1) может происходить его деполимеризация и, как следствие, снижение эффективности КП (1) в составе пневмококковых вакцин. Установлено, что при конъюгации белка-носителя с моносахаридом (1) существует риск деструкции иммуногенных эпитопов [54, 66].

Синтетические олигосахаридные антигены могут быть получены таким образом, что при конъюгации с белком-носителем протективные эпитопы остаются интактными. Олигосахариды (2–5), соответствующие фрагментам цепи КП серотипа 1 (рис. 1), были синтезированы рядом авторов [67–71]. Показано, что остаток D-ААТ важен для распознавания КП (1). Так, в опытах по изучению взаимодействия синтетических лигандов (2–5) с антителами сыворотки, специфичной к КП (1), установлено, что наилучшим образом связывался именно трисахарид (4), соответствующий полностью повторяющемуся звену, в то время как дисахарид (5), не содержащий остатка D-ААТ, связывался значительно слабее, а моносахариды (2) и (3) не связывались совсем.

Восстановлением дисульфидной группы в трисахаридном производном (4) до тиольной и последующим взаимодействием с белком CRM197 был получен вакцинный гликоконъюгат (6). В используемых условиях не затрагивается аминокруппа в составе D-ААТ. При иммунизации кроликов конъюгат (6) индуцировал образование высоких титров антител, специфичных к КП (1), трисахари-

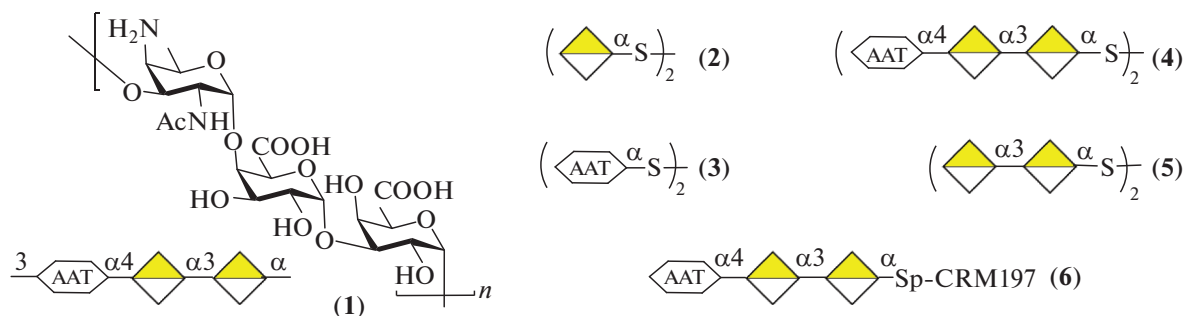


Рис. 1. Строение капсулярного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 1 (повторяющееся звено (1)), синтезированных родственных олигосахаридных производных (2–5) и конъюгата с CRM197 (6). Здесь и далее для изображения олигосахаридных последовательностей использованы символичные обозначения моносахаридных остатков.

ду (4), а также связывающихся непосредственно с D-AAT (3). При этом титры антител к КП (1) при иммунизации конъюгатом (6) оказались выше, чем в контрольных опытах с Prevnar 13[®] [64]. С помощью проточной цитометрии показано, что антитела, индуцированные конъюгатом (6), лучше связываются с пневмококками серотипа 1, чем антитела, полученные после иммунизации с помощью Prevnar 13[®]. Антигенсвязывающая способность антител коррелировала с опсонофагоцитарной киллерной активностью. Так, пуловая сыворотка кроликов к конъюгату (6) обладала более высокой активностью в отношении пневмококков серотипа 1, чем сыворотка к Prevnar 13[®]. Более того, антитела, индуцированные конъюгатом (6), обладали лучшей опсонизирующей способностью, чем стандартная сыворотка 007sp, рекомендуемая ВОЗ для оценки эффективности пневмококковых вакцин [72]. Антитела к белку-носителю (CRM197) не связывались с *S. pneumoniae* серотипа 1.

Протективную активность иммунных сывороток оценивали в опытах по пассивной иммунизации мышей, подсчитывая количество бактериальных клеток в крови и в бронхоальвеолярной лаважной жидкости после заражения. В качестве групп сравнения использовали сыворотку кроликов, иммунизированных Prevnar 13[®] и CRM197. При анализе крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости введение сыворотки к конъюгату (6) выявило существенное снижение бактериальной нагрузки по сравнению с сыворотками к Prevnar 13[®] и CRM197. Таким образом, синтезированный конъюгат (6) является перспективным кандидатом для вакцины против *S. pneumoniae* серотипа 1 и превосходит по своим протективным характеристикам конъюгат соответствующего КП в составе коммерческой вакцины Prevnar 13[®] [64].

S. pneumoniae серотипа 2. *S. pneumoniae* серотипа 2 относится к инвазивным штаммам пневмококка, но его КП (7) не входит в состав коммерческих конъюгированных пневмококковых вакцин.

Для определения структуры протективного олигосахаридного эпитопа была синтезирована серия фрагментов (8a–13a) повторяющегося звена, а также гексасахарид (14a), соответствующий одному повторяющемуся звену КП серотипа 2 [73] (рис. 2). В экспериментах по связыванию этих олигосахаридов с сыворотками, специфичными к КП серотипа 2 (7), было показано, что для эффективного взаимодействия важно присутствие боковой цепи α-D-GlcA-(1→6)-α-D-Glc-(1→2) (8a). Был получен конъюгат гексасахарид (14a) с CRM197 (14b), который стимулировал T-зависимый и B-клеточный ответ с образованием опсонизирующих антител у мышей, что приводило к киллингу инкапсулированных бактерий вследствие усиления активности фагоцитов. Подкожная иммунизация гликоконъюгатом (14b) защищала мышей от интраназального заражения высоковирулентным штаммом серотипа 2 NCTC 7466, снижая бактериальную нагрузку в легочной ткани и крови [73].

S. pneumoniae серотипа 3. КП этого серотипа пневмококка (15) характеризуется низкой иммуногенностью [52, 53, 74]. Одной из причин низкой иммуногенности КП серотипа 3, по мнению Choi et al., является необычный путь синтеза его КП (15) [75] (рис. 3). В настоящее время установлен механизм синтеза КП для всех известных 94 серотипов пневмококка. Существуют два пути синтеза КП: синтаза-зависимый и wzu-зависимый [76–79]. Главное различие между ними состоит в том, что при wzu-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 wzu-зависимому пути, и штаммы только двух серотипов 3 и 37 синтезируют КП по синтаза-зависимому пути [77, 80]. *S. pneumoniae* серотипа 37 крайне редко встречается у человека, тогда как серотип 3 является клинически значимым [81]. Показано, что КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (15) может быть связан с бакте-

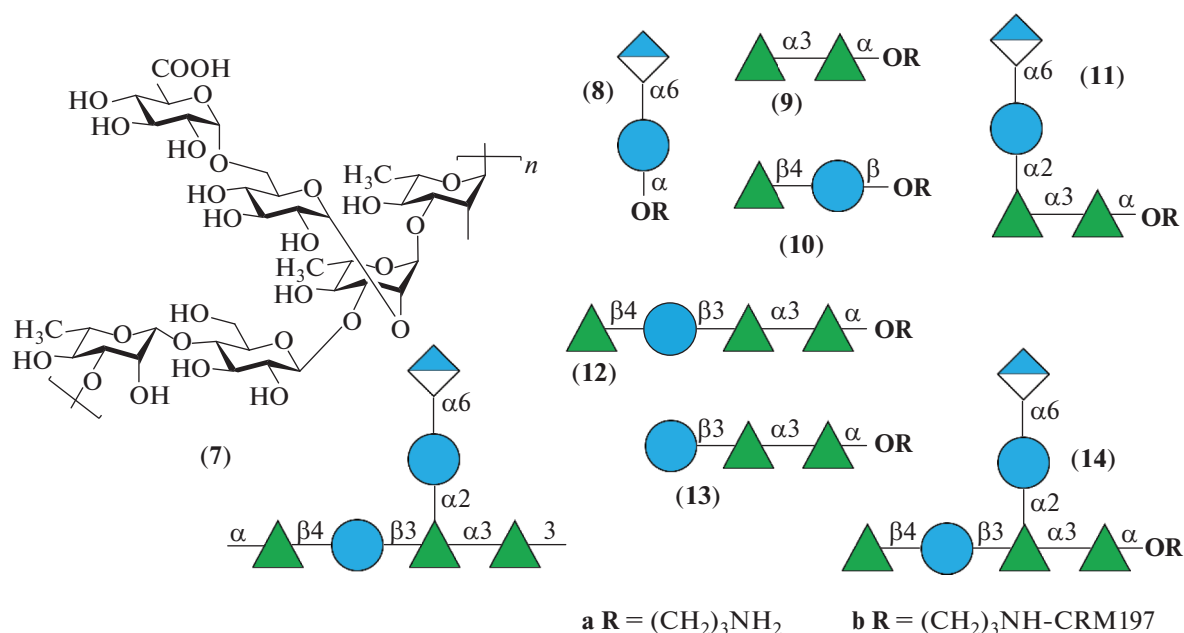


Рис. 2. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 2 (повторяющееся звено (7)), синтезированных родственных олигосахаридов (8a–14a) и конъюгатов с CRM197 (серия b).

риальной стенкой и одновременно находится в растворенном состоянии в культуральной среде [82]. При культивировании *in vitro* *S. pneumoniae* серотипа 3 и при заражении мышей происходит высвобождение в окружающую среду большего количества КП по сравнению с другими серотипами пневмококка, что приводит к уменьшению антителозависимого киллинга бактерий и снижению защиты от заражения путем связывания свободных антител с КП. Не исключено, что КП, с которым связались антитела, также может отделяться от бактерии и поступить в окружающую среду, снижая защитные свойства антител.

Изменения в структуре бактериального КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (15) могут отразиться на качестве вакцинных препаратов. Для устранения этого недостатка перспективным является использование синтетических олигосахаридов — фрагментов КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (15), конъюгированных с белком-носителем.

Работы по синтезу фрагментов КП пневмококков серотипа 3 (15) были фактически первыми исследованиями в области полусинтетических конъюгированных углеводных вакцин [55]. Показано, что для выработки протективного иммунитета необходимо присутствие в вакцинном конъюгате остатка глюкуроновой кислоты [55, 83]. Позднее были получены конъюгаты с белком-носителем CRM197 синтетических моносахаридов (16a) и (17a), дисахарида (19a), трисахарида (20a) и тетрасахарида (22a), соответствующих фрагментам повторяющихся звеньев КП *S. pneumoniae* серотипа 3 [61] (рис. 3). Все мыши, иммунизиро-

ванные синтезированными конъюгатами (20b) и (22b), продуцировали IgG-антитела, способные связываться с КП (15). Сравнимые титры специфических антител в случае конъюгата дисахаридного лиганда (19b) наблюдались у 75% исследованных мышей. Все животные, в сыворотке которых присутствовали антитела к КП (15), выжили после заражения летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3. Таким образом, было подтверждено, что дисахаридный фрагмент (19) достаточен для выработки защитного иммунитета к пневмококкам серотипа 3 у мышей.

Следует отметить, что в отличие от мышей, для индукции оптимального иммунного ответа у человека требуются более длинные олигосахариды, в первую очередь потому, что конформационные эпитопы лучше презентуются клеткам иммунной системы [84]. В то же время возможность индукции Т-зависимого иммунного ответа увеличивается с уменьшением длины олигосахаридной цепи. Поэтому для наилучшей презентации олигосахаридные эпитопы должны иметь и иммуногенную конформацию, и оптимальную длину. При этом длина олигосахаридов должна быть, с одной стороны, достаточной для экспрессии конформационных эпитопов, с другой стороны — не слишком большой для индукции Т-зависимого ответа [30].

В другом исследовании была синтезирована группа лигандов (16a–22a), которые были иммобилизованы на подложке с образованием соответствующего гликоаррея (GlycoArray). С использованием этого инструмента был проведен автоматизирован-

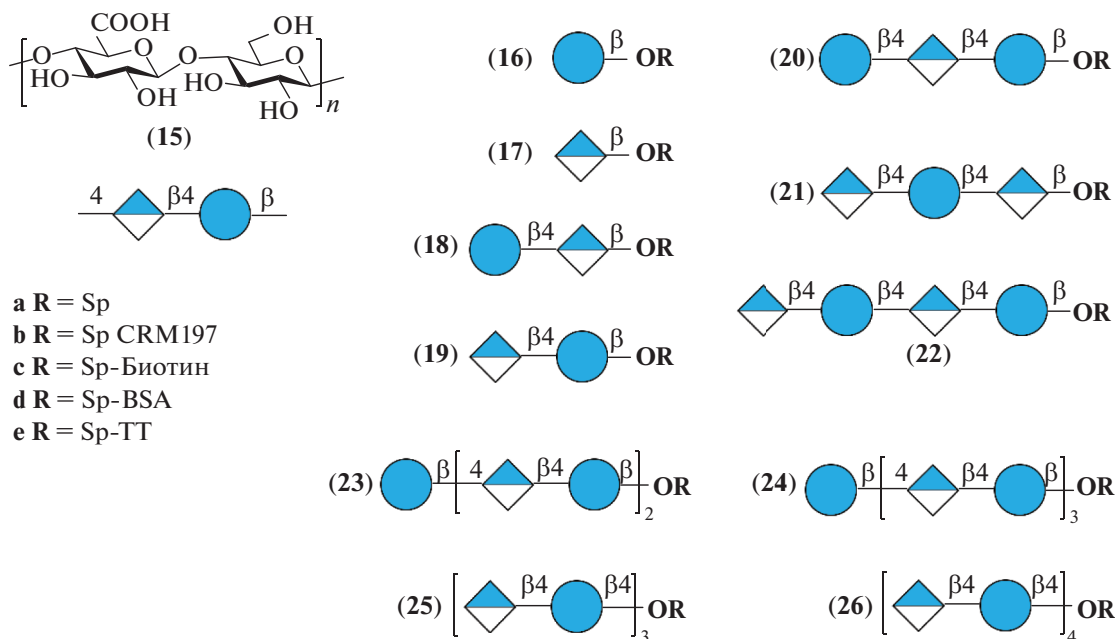


Рис. 3. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 (повторяющееся звено (15)), синтезированных родственных олигосахаридов (16–26) и гликоконъюгатов на их основе (серии b–e).

ный скрининг (Glucan Array Assay) двух протективных моноклональных антител (mAb), специфичных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (15) [62]. Оба антитела распознавали КП *S. pneumoniae* серотипа 3 в ходе автоматизированного скрининга, а наилучшее связывание обоих mAb наблюдали в случае тетрасахарида (22a). Несколько слабее рассматриваемые mAb связывались с трисахаридами (20a) и (21a), при этом наблюдалось различие в специфичности между двумя mAb. Однако ни одно из mAb не связывалось с дисахаридами (18a) и (19a). Поэтому в дальнейшем в качестве возможной вакцины исследования были проведены с тетрасахаридным конъюгатом (22b).

Иммунизация конъюгатом (22b) приводила к выработке защитных антител, что было показано в тестах на опсонизирующую способность и на модели экспериментальной пневмонии при пассивной иммунизации мышей с последующим заражением *S. pneumoniae* серотипа 3. По данным MALDI-TOFF-масс-спектрометрии, полученный конъюгат (22b) содержал в среднем шесть тетрасахаридных гаптенных на одну молекулу CRM197 [85]. Для определения иммуногенности тетрасахарида мышей иммунизировали подкожно с интервалом 28 дней двумя дозами гликоконъюгата (22b) с адъювантом Фрейнда или с гидроксидом алюминия. Использование гидроксида алюминия является предпочтительным по сравнению с фосфатом алюминия, который входит в состав гликоконъюгатных вакцин, т.к. гидроксид при нейтральных значениях pH лучше адсорбирует конъюгат CRM197,

содержащий отрицательно заряженные олигосахариды *S. pneumoniae* серотипа 3 [86].

Иммунизированные мыши вырабатывали IgG-антитела, которые специфически связывались с тетрасахаридом (22c), что демонстрирует иммуногенность выбранного лиганда. Переключение иммунного ответа с IgM на IgG в ответ на введение бустерной дозы указывали на образование T-зависимого иммунного ответа. Однако иммуногенность конъюгированного тетрасахарида в значительной степени зависела от использованного адъюванта. Гликоконъюгат (22b) с адъювантом Фрейнда индуцировал образование более высокого титра антител по сравнению с использованием гидроксида алюминия [62].

Сыворотка, полученная от мышей, иммунизированных конъюгатом (22b), вызвала дозозависимый киллинг пневмококка, демонстрируя, что гликоконъюгат индуцирует образование опсонизирующих антител. Титр антипневмококковых антител, так же как и опсонофагоцитарная активность, зависел от использованного адъюванта. Адъювант Фрейнда вызывал образование более высокого титра антител с высокой киллерной активностью в тесте опсонофагоцитоза по сравнению с использованием гидроксида алюминия. Протективную активность тетрасахаридного конъюгата (22b) в отношении пневмококковой пневмонии исследовали при использовании известной модели [87, 88].

Поскольку адъювант Фрейнда не используют при создании вакцин, авторы вводили гликоконъю-

югат (22b), адсорбированный на гидроксиде алюминия, и гликоконъюгат (22b) без адъюванта. Иммунизация конъюгатом (22b), адсорбированным на гидроксиде алюминия, значительно уменьшала тяжесть течения заболевания. Пневмококковая пневмония существенно увеличивала проницаемость легких у контрольных животных и мышей, иммунизированных конъюгатом (22b) без адъюванта. Использование конъюгата (22b), адсорбированного на гидроксиде алюминия, сохраняло целостность альвеолярного барьера, снижало бактериальную нагрузку в легких, а также практически полностью предотвращало развитие бактериемии по сравнению с контролем и гликоконъюгатом (22b) без адъюванта. Антибактериальная защита сопровождалась увеличением количества лейкоцитов и снижением продукции цитокинов в альвеолярном компартменте (compartment) у инфицированных пневмококком мышей. Индукция длительного иммунитета является важным показателем успешной вакцинации. Через 4 месяца защита от инфекции была меньше, чем при заражении на 35-й день после иммунизации. Для изучения способности конъюгата (22b) индуцировать длительную иммунную защиту в отношении пневмококков серотипа 3 проводятся дополнительные испытания. Ранее было показано, что в некоторых случаях для возникновения длительной иммунной памяти необходимо удлинение углеводного лиганда [62].

Авторами данного обзора были также синтезированы олигосахариды (19a), (20a), (22a) и их конъюгаты с биотином (19c), (20c) и (22c) соответственно (статья готовится к печати). Было показано, что биотинилированные производные (19c), (20c) и (22c), предварительно иммобилизованные на покрытых стрептавидином микропланшетах, стимулировали продукцию IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , IL-17A и TNF α , но не IL-6 и GM-CSF, в монокультуре спленоцитов мышей. Конъюгат тетрасахарида (22c) наиболее эффективно стимулировал выработку IL-4, IL-5, IL-10 и IFN γ , которые способствуют экспрессии специфических изоформ иммуноглобулинов. Конъюгат с BSA (22d), адсорбированный на гидроксиде алюминия, вызывал образование высоких уровней антител классов IgM, IgG1, IgG2a и IgG2b. Определить содержание анти-КП-индуцированных антител можно было только с помощью биотинилированного тетрасахарида (22c). Конъюгат (22d) обладал самой высокой способностью связывать IgG-антитела в иммунных сыворотках мышей к гликоконъюгатам и антибактериальной сыворотке кроликов. Сыворотки к конъюгату (22d) способствовали большому фагоцитозу бактерий нейтрофилами и моноцитами, чем антисыворотка к конъюгату полисахарида (15) КП-CRM197. Сыворотка мышей, иммунизированных конъюгатом тетрасахарида (22d), демонстрировала самый вы-

сокий титр IgG1-антител к КП по сравнению с сыворотками мышей, иммунизированных теми же дозами конъюгатов ди- (19d) и трисахарид (20d). При внутрибрюшинном заражении летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3 конъюгаты три- (20d) и тетрасахарида (22d) защитили мышей с большей степенью достоверности по сравнению с конъюгатом дисахарид (19d). На основании проведенных исследований показано, что тетрасахаридный лиганд (22a) является оптимальным кандидатом для разработки полусинтетической вакцины против *S. pneumoniae* серотипа 3 и диагностических тест-систем.

Были также синтезированы более длинные фрагменты КП серотипа 3 (15), включающие в себя до четырех повторяющихся звеньев этого полисахарида (соединения (23a–26a)) [89]. Среди этих лигандов были олигосахариды, содержащие на невозстанавливаемом конце как остаток глюкозы (23a, 24a), так и остаток глюкуроновой кислоты (25a, 26a). Были получены конъюгаты этих соединений с BSA (23d–26d) и столбнячным анатоксином (23e–26e). Конъюгаты (23e–26e) и свободные олигосахариды (23a–26a) были использованы для иммунизации мышей, в то время как конъюгаты с BSA (23d–26d) применялись как порывающие антигены при анализе полученных после иммунизаций сывороток методом ИФА. Сыворотки мышей, иммунизированных конъюгатами столбнячного анатоксина (23e–26e), содержали гораздо большие титры специфических антител, чем антисыворотки к свободным олигосахаридам (23a–26a). Примечательно, что титры специфических антител, индуцированных пента- и гексасахаридными конъюгатами (23e и 25e соответственно), существенно превосходили аналогичные титры, полученные в случае окта- и гептасахаридных конъюгатов (24a и 26a соответственно), что свидетельствует о том, что дальнейшее увеличение длины углеводных лигандов отрицательно сказывается на иммунологических свойствах конъюгатов [89].

***S. pneumoniae* серотипа 4.** В структуре КП пневмококков серотипа 4 (27) содержится редкий и лабильный заместитель (циклический пируватный кеталь) на терминальном остатке галактозы на восстанавливаемом конце. Недавно Seeberger et al. синтезировали большой набор фрагментов этого полисахарида (28a–35a) (рис. 4), среди которых были олигосахариды разной длины, а также соединения, с помощью которых предполагалось установить, насколько критичным является наличие пируватного заместителя [90, 91].

Антитела в референсной сыворотке человека, специфичной к КП серотипа 4 (27), распознавали в равной степени как олигосахариды, содержащие пируватный фрагмент, так и олигосахариды с незамещенными остатками галактозы. Тетрасахарид (35a) обладал наивысшей аффинностью и

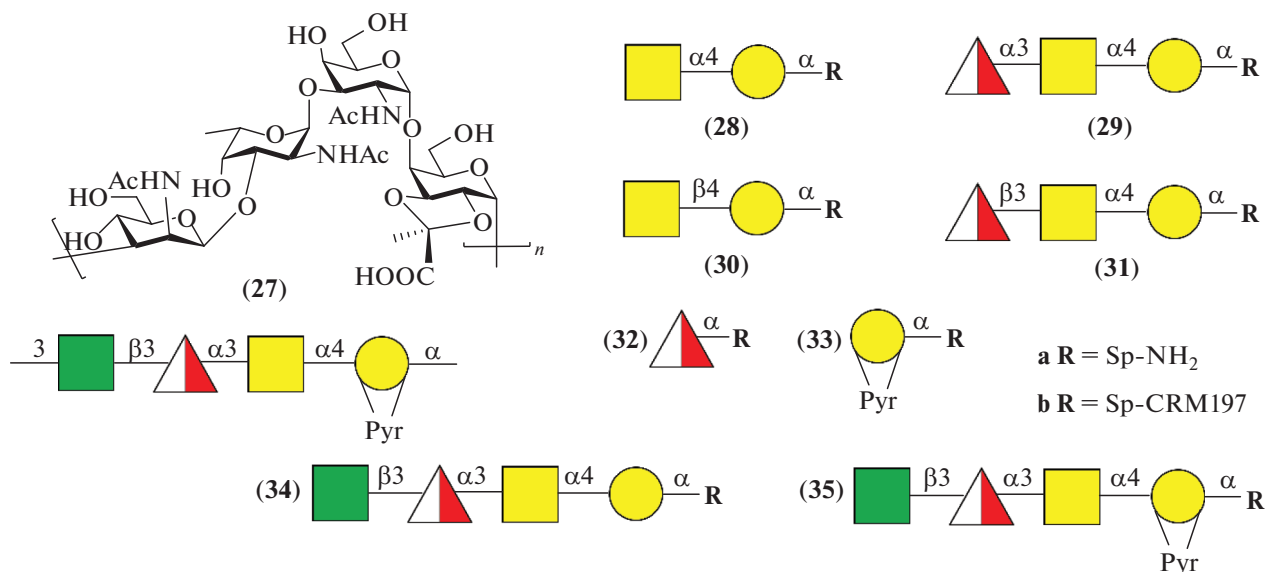


Рис. 4. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 4 (повторяющееся звено (27)), синтезированных родственных олигосахаридов (28а–35а) и конъюгатов с CRM197 (серия б).

кросс-реактивностью в отношении КП (27) при исследовании сывороток мышей и человека, иммунизированных КП серотипа 4 (27). Поскольку антитела сыворотки человека распознавали также олигосахариды без пируватного заместителя (29а, 34а), исследователи предположили, что в природном КП также могут встречаться звенья, не несущие пируватного заместителя в остатке галактозы. Однако не содержащие пирувата эпитопы могут быть менее иммуногенными, о чем свидетельствует более слабое связывание антител с олигосахаридами (29а) и (34а) по сравнению с тетрасахаридом (35а), содержащим пируват. Для проверки этой гипотезы были синтезированы конъюгаты (29б) и (34б), лиганды которых не содержали пируватного заместителя. Антитела, полученные при иммунизации мышей конъюгатами (29б) и (34б), не распознавали КП серотипа 4, что свидетельствует о важности присутствия пирувата для выработки специфического иммунитета [90, 91].

***S. pneumoniae* серотипа 5.** Серотип 5 вызывает инвазивные пневмококковые заболевания у детей во всем мире [11, 92]. Коммерческие гликоконъюгатные вакцины производят из нативных или деполимеризованных КП [93] и конъюгируют с белком-носителем. Однако была выявлена их недостаточная эффективность в предупреждении инфекций, вызываемых серотипом 5 [94]. Повторяющееся звено КП серотипа 5 (36) (рис. 5) содержит два редких моносахаридных остатка: 2-ацетамидо-2,6-дидеокси-*D*-ксилоза-гексоза-4-улоза (Sugr) и *N*-ацетил-*L*-пневмозамин (*L*-PneuNAc). КП серотипа 5 (36), так же как КП серотипа 1 (1), является слабым звеном существующих пневмококковых вакцин (он входит в состав 10- и

13-валентных вакцин), т.к. в процессе его выделения из бактериальных источников и очистки для получения конъюгированной вакцины кетогруппа остатка Sugr подвергается частичному или полному восстановлению, что приводит к получению гетерогенного продукта со сниженной иммуногенностью по сравнению с нативным КП серотипа 5 (36) [95, 96].

Предварительные исследования с использованием большой группы моно- и дисахаридных фрагментов повторяющегося звена полисахарида (36) и стандартных сывороток кролика и человека для типирования пневмококков серотипа 5 показали, что наиболее важным для распознавания является ответвление GlcA-PneuNAc [95]. Попытки синтезировать повторяющееся звено КП (36) оказались неудачными, т.к. кетогруппа в остатке Sugr крайне нестабильна, и продукт не удалось выделить в чистом виде.

По данным проведенного автоматизированного скрининга, остаток Sugr не являлся иммунодоминантным, поэтому для получения вакцинных конъюгатов были синтезированы более стабильные олигосахариды с восстановленной кетогруппой (37а–39а), два из которых (38а, 39а) содержали остаток фукозамина, а также тетрасахарид (37а) с остатком хинавозамина на восстанавливаемом конце [95] (рис. 5). Антитела в сыворотках, специфичных к КП серотипа 5 (36) (были использованы сыворотки кролика и человека для типирования данного серотипа, а также антисыворотка кролика к вакцине Pnevna 13®), хорошо связывались с обоими пентасахаридами (37а, 38а) и несколько хуже – с тетрасахаридом (39а).

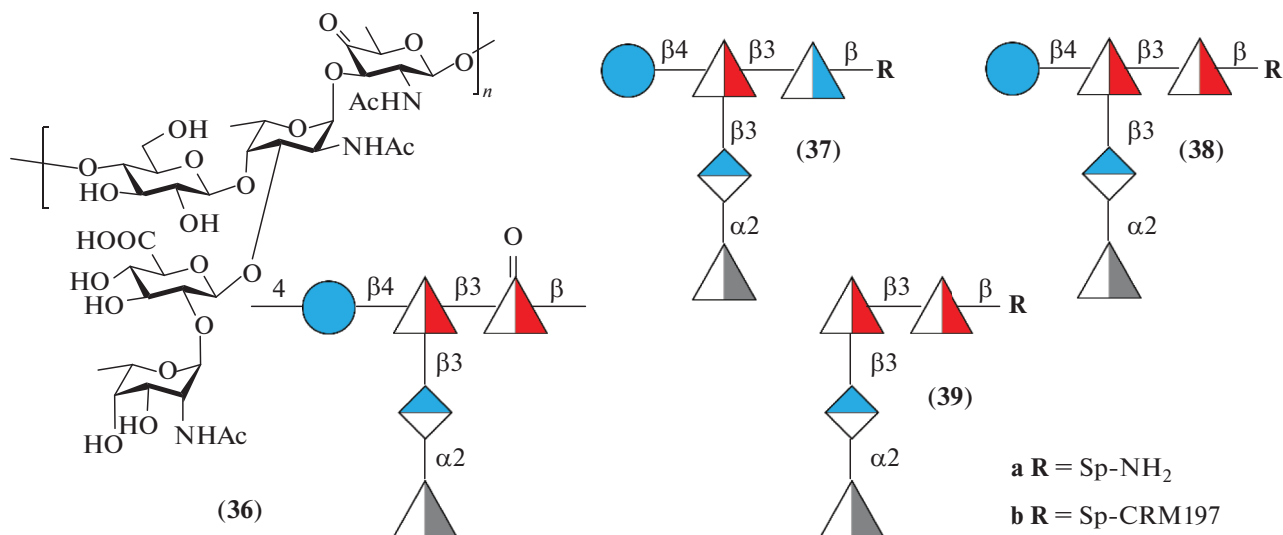


Рис. 5. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 5 (повторяющееся звено (36)), синтезированных родственных олигосахаридов (37а–39а) и конъюгатов с CRM197 (серия б).

Поскольку химический синтез лиганда (37а) был достаточно трудоемким, для иммунологических экспериментов были получены только конъюгаты (38б) и (39б). Конъюгат (38б) стимулировал образование у кроликов более высоких титров кросс-реактивных антител, чем конъюгат тетрасахарида (39б). Индуцированные конъюгатом (38б) антисыворотки распознавали помимо самого пентасахаридного лиганда (38а) также пентасахарид (37а) и КП (36). Эти данные подчеркивают, что для получения иммуногенного вакцинного конъюгата необходимо использование полного повторяющегося звена КП серотипа 5 (36).

Оба конъюгата (38б, 39б) вызывали у кроликов образование антител, превосходящих по опсонизирующей способности антитела в сыворотке к мультивалентной вакцине Prevnar 13[®], при этом антитела к пентасахариду в составе конъюгата (38б) обладали более сильным антибактериальным действием *in vitro*, чем антитела к тетрасахаридному конъюгату (39б). Однако защитные функции антисывороток определяются не только титрами опсонизирующих антител, но и их авидностью по отношению к нативному КП на поверхности бактерий. Количественно определенные значения авидности к КП (36) в тестах с ингибированием связывания цианатом аммония показали, что авидность антител, индуцированных конъюгатом (38б), более чем в 4 раза превосходит авидность антисывороток к конъюгату (39б) и вакцине Prevnar 13[®].

Хотя активность полусинтетических конъюгатов (38б) и (39б) была сопоставлена со сравнимой дозировкой конъюгата КП серотипа 5 (36) в составе вакцины Prevnar 13[®], возможно, что присутствие дополнительных серотипов в мультивалентной вакцине снижает активность индивиду-

альных КП других серотипов, и поэтому такое сравнение не вполне корректно [97, 98]. Эффективные вакцины приводят к выработке длительного иммунного ответа и формированию В-клеток памяти. В данном исследовании титры специфических антител у кроликов, иммунизированных конъюгатом (38б), снижались к 119-му дню после первичной иммунизации, однако введение бустерной дозы приводило к быстрому возрастанию уровня антител, что свидетельствует о сильной иммунологической памяти. Таким образом, пентасахаридный конъюгат (38б) является перспективным кандидатом для вакцины против пневмококков серотипа 5.

***S. pneumoniae* серотипа 6.** *S. pneumoniae* серотипа 6В является частой причиной пневмококковых заболеваний, особенно у детей [99, 100], и его также ассоциируют с антибиотикорезистентностью [101–103]. КП *S. pneumoniae* серотипа 6В (41) (рис. 6) входит в состав как 23-валентных полисахаридных вакцин первого поколения Pneumovax 23[®] (Merck Sharp & Dohme Corp.) и Pneumo 23[®] (Sanofi), так и в состав всех конъюгированных пневмококковых вакцин, выпускаемых в настоящее время. КП (41) содержит в своем составе фосфатную группу, и его конъюгация с белком-носителем не всегда проходит успешно. Индуцированные КП (41) антитела характеризуются медленным созреванием аффинности по сравнению с КП других серотипов пневмококка [104], и в связи с этим количество КП серотипа 6В (41) пневмококка в конъюгированных вакцинах увеличено в 2 раза по сравнению с КП других серотипов. *S. pneumoniae* серотипа 6В относится к серогруппе 6, включающей еще три сероварианта, полисахариды которых обладают незначительными раз-

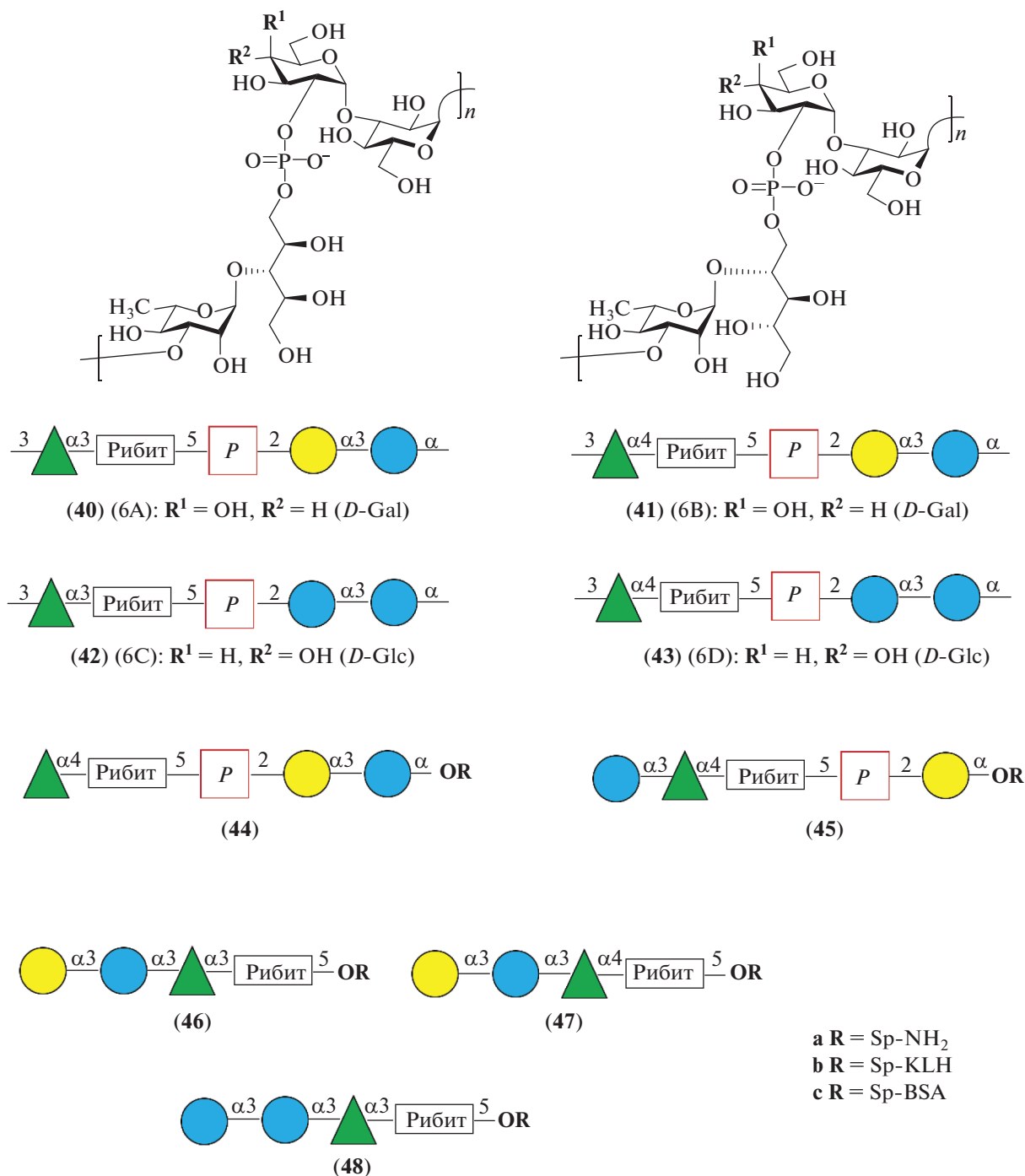


Рис. 6. Структура капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипов 6А, 6В, 6С и 6D (повторяющиеся звенья (40–43)), синтезированных родственных олигосахаридов (44а–48а), а также конъюгатов с KLH (серия b) и BSA (серия c).

личиями: 6А (40), 6С (42) и 6D (43) (рис. 6), однако наибольшее клиническое значение имеют *S. pneumoniae* серотипов 6А и 6В.

Вследствие незначительных структурных различий между КП серогруппы 6 антитела к КП *S. pneumoniae* серотипа 6В обладают перекрестной антигенной активностью в отношении *S. pneumoniae* серотипов 6А, 6D и 6С [105–107]. Это подтвер-

ждается тем, что случаи выявления серотипа 6А стали реже после начала применения конъюгированной пневмококковой вакцины, содержащей в своем составе КП 6В [55]. Однако это может быть связано и с тем, что генные мутации способны приводить к синтезу нескольких типов повторяющихся звеньев в составе одного КП. Так, были обнаружены пневмококки, способные продуци-

ровать “смешанный” КП серотипа 6А/6В [108], что зависит от штамма-продуцента КП, состава питательной среды и условий культивирования штаммов *S. pneumoniae*.

Конъюгированные с белком-носителем синтетические аналоги КП, содержащие протективные эпитопы соответствующих серотипов пневмококка, могут приводить к образованию более высокого титра специфических антител, чем конъюгаты бактериальных КП [109, 110]. Это было продемонстрировано и с использованием олигосахаридов, соответствующих фрагментам цепи КП *S. pneumoniae* серогруппы 6, синтез которых был проведен несколькими исследовательскими лабораториями. Наиболее активными оказались олигосахариды, имеющие размер не менее полных повторяющихся звеньев [55]. Так, были синтезированы содержащие фосфаты тетрасахариды (**44a**) и (**45a**), а также тетрасахариды без фосфатной группы (**46**), (**47**) и (**48**) (рис. 6), имитирующие повторяющиеся звенья КП серотипов 6А, 6В и 6С соответственно [111–113]. Показано, что конъюгат фосфатсодержащего тетрасахарида с белком KLH (**44b**) вызывал у мышей и кроликов образование антител, способных перекрестно связываться с КП как серотипа 6В (**41**), так и серотипа 6А (**40**), а также стимулировать фагоцитоз микробных клеток пневмококка серотипов 6А и 6В [60].

В экспериментах по пассивной и активной иммунизации мышей антисыворотка кроликов к конъюгату (**44b**) защищала мышей от заражения пневмококком серотипов 6А и 6В. Это позволило сделать вывод о том, что тетрасахарид (**44a**), конъюгированный с белком-носителем (конъюгат **44b**), является эффективным компонентом вакцины, способным индуцировать образование защитных антител к *S. pneumoniae* серотипов 6А и 6В [60]. Противоречащие данному выводу результаты получены в экспериментах по исследованию тетрасахарида (**46a**), в составе которого нет фосфатной группы. КП серотипа 6В не ингибировал взаимодействие антител кролика с конъюгатом (**46b**). Это может означать, что эпитопы, представленные в КП серотипа 6В, отличаются от представленных в нефосфорилированном тетрасахарида (**46a**) [114–116]. Таким образом, для получения эффективной конъюгированной вакцины против *S. pneumoniae* серогруппы 6 необходимо использовать фосфатсодержащие тетрасахариды, соответствующие повторяющемуся звену КП *S. pneumoniae* серотипов 6А и 6В.

***S. pneumoniae* серотипа 7F.** *S. pneumoniae* серотипа 7F до 2012 г. был пятым по распространенности среди 97 серотипов, вызывающих инвазивные пневмококковые заболевания в Европе, однако с введением 13-валентной вакцины, в состав которой входит КП серотипа 7F (**49**) (рис. 7), количество пневмоний, обусловленных этим сероти-

пом, уменьшилось [117]. Повторяющееся звено КП (**49**) содержит семь моносахаридных остатков, среди которых четыре в основной цепи, а также присутствуют два ответвления. Для определения минимального гликотопа, способного вызывать образование специфичного иммунного ответа в отношении КП серотипа 7 (**49**), был синтезирован ряд спейсерированных олигосахаридов (**51–56**) [117] (рис. 7), которые были выбраны таким образом, чтобы определить вклад каждого из ответвлений во взаимодействие со специфичными антителами. Гептасахарид, соответствующий полному повторяющемуся звену, не планировали синтезировать ввиду трудоемкости введения остатка α -N-ацетилглюкозамина.

Для установления эпитопов, ответственных за связывание с антителами человека, была использована автоматизированная система микроанализа, с помощью которой изучали взаимодействие олигосахаридов (**51–56**) с антителами референсной сыворотки человека 007sp [72]. Эта сыворотка связывалась с олигосахаридами (**51–55**), однако не связывалась с трисахаридом (**56**). Добавление КП серотипа 7F эффективно ингибировало взаимодействие сыворотки 007sp с олигосахаридами (**51–56**), нанесенными на поверхность микрочипа (наименьшее ингибирование наблюдали в случае тетрасахарида (**52**)). Родственный КП серотипа 7А (**50**), в котором отсутствует остаток галактозы в боковой цепи, также был способен ингибировать взаимодействие сыворотки 007sp с олигосахаридами (**51–56**), однако в меньшей степени, чем КП серотипа 7F (**49**). Авторами был сделан вывод, что оба боковых ответвления в структуре углеводного лиганда играют важную роль при распознавании специфичными антителами, и это нужно учитывать при дальнейшем конструировании полусинтетической конъюгированной вакцины. Кросс-реактивность, которую наблюдали в экспериментах ингибирования, дает основания полагать, что синтетические антигены, являющиеся фрагментами КП серотипа 7F (**49**), будут вызывать образование антител как к серотипу 7F, так и к серотипу 7А [117].

***S. pneumoniae* серотипа 8.** Полисахарид этого серотипа был включен в состав 23-валентных полисахаридных вакцин Pneumovax 23[®] и Pneumo 23[®], однако не является компонентом конъюгированных полисахаридных вакцин, выпущенных позднее. Встречаются штаммы данного серотипа, устойчивые к таким антибиотикам, как эритромицин, клиндамицин, тетрациклин и ципрофлоксацин [118]. Более того, этот мультирезистентный серотип наиболее часто обнаруживают у ВИЧ-инфицированных пациентов [119].

Повторяющееся звено КП серотипа 8 (**57**) (рис. 8) представляет собой линейный тетрасахарид, который содержит дисахаридный фрагмент,

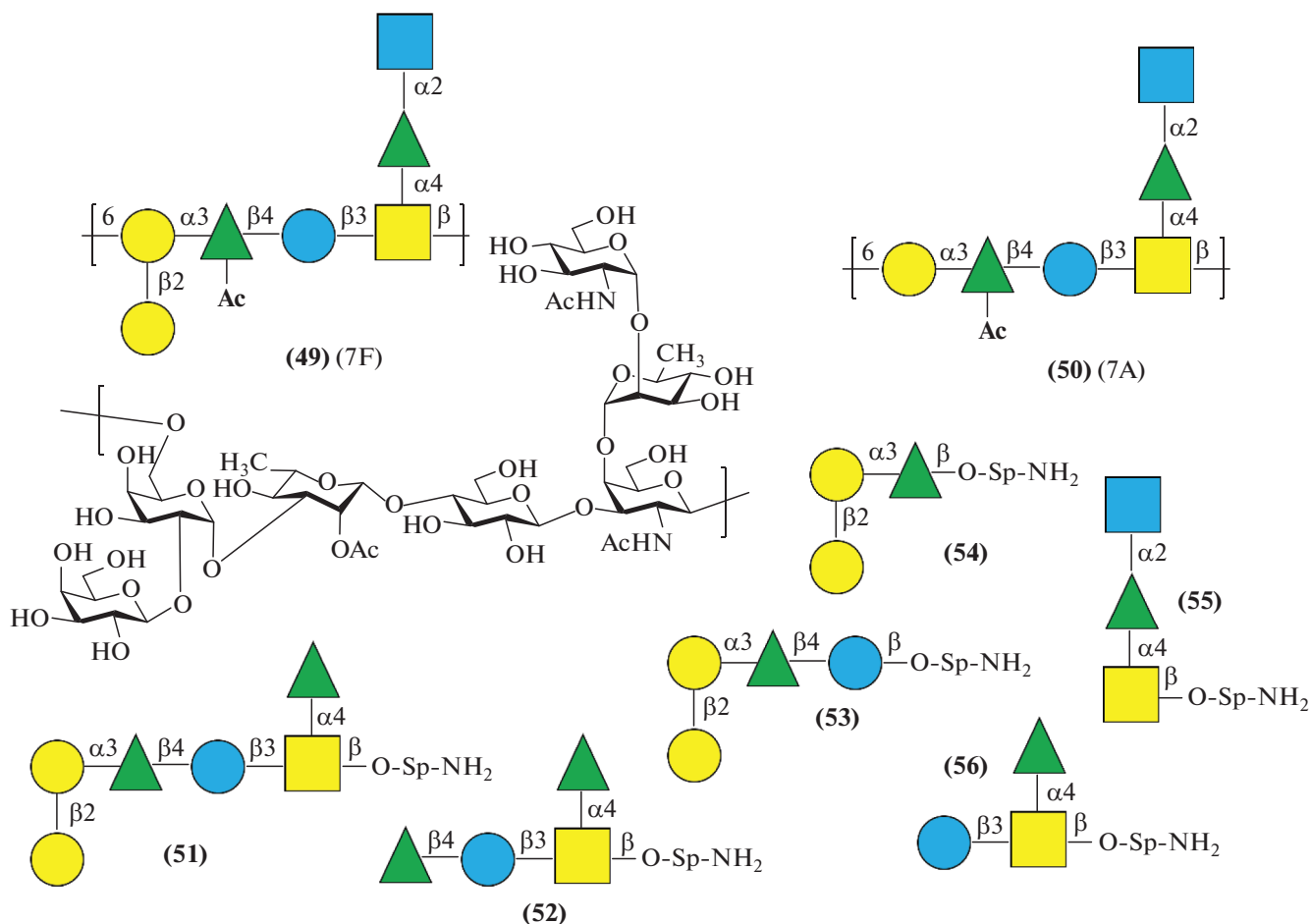


Рис. 7. Структура капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 7F (повторяющееся звено (49)) и синтезированных родственных олигосахаридов (50–56).

соответствующий целлюбиуроновой кислоте [β -D-GlcA-(1→4)- β -D-Glc], представленный также в КП пневмококков серотипа 3.

Для определения структуры протективного эпитопа Seeberger et al. была синтезирована серия тетрасахаридов (58a–61a) [119] (рис. 8), которые представляли все возможные моносахаридные последовательности (получены путем сдвига рамки считывания) для тетрасахаридного повторяющегося звена КП (57). С помощью автоматизированного микроанализа для панели антигенов (58a–62a) было установлено, что тетрасахарид (60a) наилучшим образом связывается с протективными моноклональными антителами, направленными на нативный полисахарид КП серотипа 8 (57).

Дальнейшее картирование защитных эпитопов в тетрасахариде (60a) было выполнено при помощи моноклональных антител, специфичных к лиганду (60a), отобранных после иммунизации мышей конъюгатом (60b). Оказалось, что наличие остатка глюкуроновой кислоты не играет решающей роли, т.к. тетрасахарид (62a), содержа-

щий остаток глюкозы на невозстанавливаемом конце, обладал профилем связывания, аналогичным тетрасахариду (60a). Конъюгаты (60b) и (62b) оказались малоиммуногенными у мышей, однако у кроликов оба конъюгата вызвали образование высоких титров антител, которые связывались как с КП серотипа 8 (57), так и с обоими тетрасахаридами (60a, 62a) [119].

Также были получены экспериментальные смешанные вакцины [119], состоящие из конъюгатов (60b) или (62b) в комплексе с коммерческой полисахаридной конъюгированной вакцине Pnevnar 13[®], которая не содержит КП серотипа 8 (57). Оба 14-валентных вакцинных препарата вызвали у кроликов образование антител, связывающихся с КП серотипа 8 (57), чего не происходило в случае иммунизации отдельно вакциной Pnevnar 13[®]. Сыворотка кроликов, иммунизированных 14-валентными вакцинами, обладала опсонизирующей способностью в отношении пневмококков серотипа 8 *in vitro*, в отличие от сыворотки кроликов, иммунизированных только с

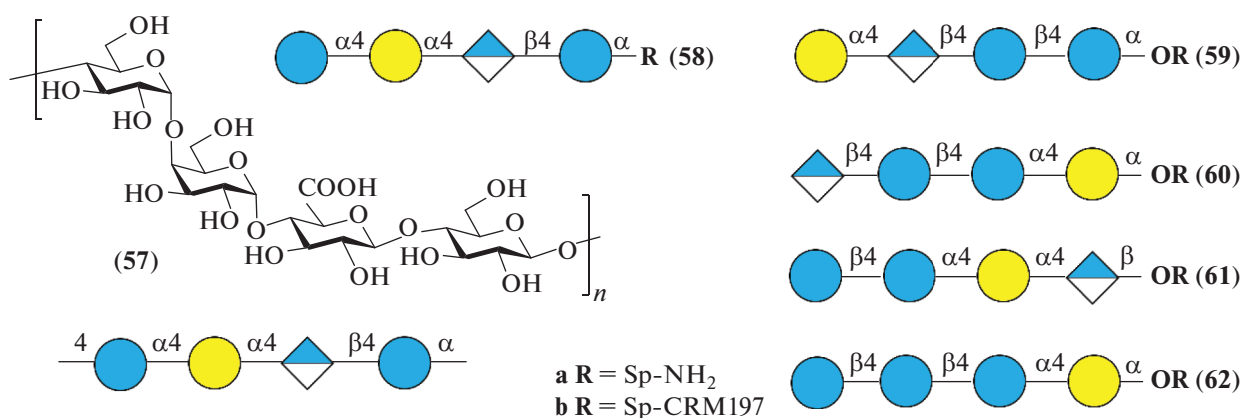


Рис. 8. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 8 (повторяющееся звено (57)), синтезированных родственных олигосахаридов (59a–62a) и конъюгатов с CRM197 (серия b).

помощью Pnevnaг 13[®]. Также было показано, что одновременное введение полусинтетических конъюгированных вакцин (60b) или (62b) с вакциной Pnevnaг 13[®] не приводит к снижению иммуногенности КП в составе коммерческой вакцины [119]. Таким образом, была продемонстрирована возможность эффективного применения конъюгатов синтетических олигосахаридных лигандов в сочетании с конъюгированными полисахаридными вакцинами. Это может быть полезно для наиболее проблемных серотипов, КП которых в составе вакцин недостаточно активны из-за структурных особенностей этих полисахаридов.

***S. pneumoniae* серотипа 9V.** КП пневмококков серотипа 9V (64) (рис. 9) входит в состав вакцины Pnevnaг 13[®]. В структуре этого КП присутствует лабильный *O*-ацетильный заместитель в остатке *N*-ацетилманнозамина (см. повторяющееся звено (63), не содержащее *O*-ацетильную группу), что осложняло выделение гомогенного полисахарида из бактериальных источников и долгое время не позволяло однозначно определить его химическое строение. Антитела, полученные против нативного КП (64), распознают как *O*-ацетилированную форму (64), так и ее *O*-деацетилированный аналог (63). Однако только антисыворотка, распознающая *O*-деацетилированный полисахарид (63), обладала опсонофагоцитарной активностью, что свидетельствует о том, что присутствие *O*-ацетата в данном случае не является необходимым для выработки протективного иммунитета [120].

В другом исследовании [121] было показано, что моноклональные антитела к КП серотипа 9V (64) в равной степени связываются с обеими формами (63, 64), обладают опсонофагоцитарной активностью и при пассивной иммунизации способны защищать мышей от заражения пневмококком серотипа 9V. Для того чтобы прояснить влияние *O*-ацетилирования КП серотипа 9V на спе-

цифичность иммунного ответа, были синтезированы и исследованы пентасахариды как с *O*-ацетильной группой (66), так и без нее (65) [122] (рис. 9).

Структуры данных соединений, в которых на “невосстанавливаемом” конце находится остаток глюкуроновой кислоты, были выбраны с учетом результатов исследований олигосахаридов, родственных КП серотипов 3 и 8, в которых была обнаружена необходимость присутствия именно конечного остатка глюкуроновой кислоты для наилучшего распознавания антителами, специфичными к соответствующим КП. С помощью полученных олигосахаридов (65, 66) было спектрально подтверждено наличие *O*-ацетильной группы при С6 остатка *N*-ацетилманнозамина в нативном полисахариде (64), и эти олигосахариды будут теперь использоваться для иммунологических исследований [122].

***S. pneumoniae* серотипа 12F.** КП серотипа 12F входит в состав пневмококковых 23-валентных полисахаридных вакцин Pneumovax 23[®] и Pneumo 23[®], а также является компонентом готовящейся к лицензированию 20-валентной полисахаридной конъюгированной вакцины Pnevnaг 20[®]. Серотипы 12F и 12A суммарно ответственны за 4% пневмококковых заболеваний [3]. Для проведения детальных иммунологических исследований (на момент написания данного обзора о них еще не сообщалось) был получен спейсерированный гексасахарид (68), представляющий собой одно повторяющееся звено полисахарида (67) [123] (рис. 10).

***S. pneumoniae* серотипа 14.** Капсулярный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 14 (69) построен из разветвленных тетрасахаридных повторяющихся звеньев (рис. 11). К настоящему моменту получен ряд синтетических олигосахаридов, соответствующих участкам цепи КП *S. pneumoniae* серотипа 14, в том числе конъюгированных с белком-носителем [124–127]. Был также синтезирован капсулярный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 14 [125],

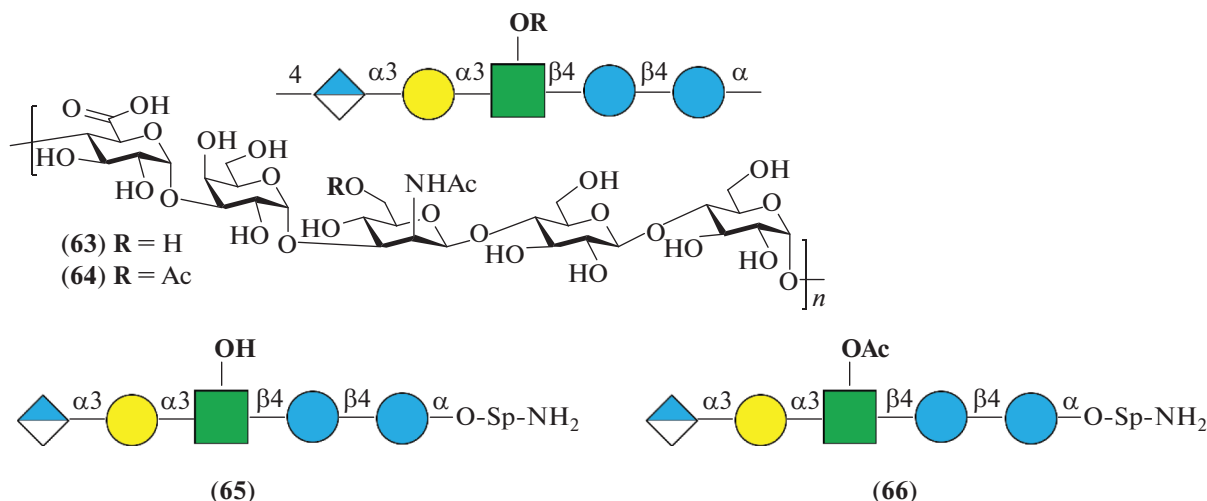


Рис. 9. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 9V (повторяющееся звено (64)), его *O*-деацетилированного производного (повторяющееся звено (63)) и синтезированных родственных олигосахаридов (65) и (66).

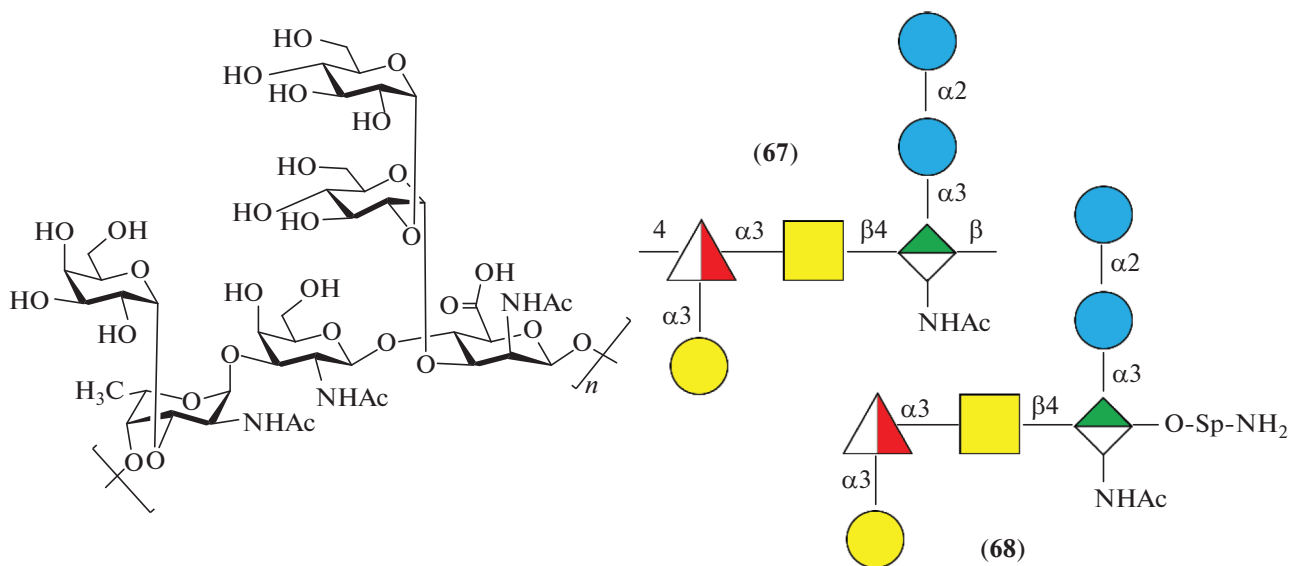


Рис. 10. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F (повторяющееся звено (67)) и синтезированного родственного олигосахарид (68).

который использовался в иммунологических исследованиях [128, 129].

В ходе исследования большой группы синтетических олигосахаридных фрагментов полисахарида (69) было установлено, что присутствие фрагмента β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -Glc на невосстанавливаемом конце олигосахаридного лиганда является необходимым для выработки антител, связывающихся с нативным КП (69) [55]. Так, конъюгаты (70b–74b) (рис. 11) в присутствии различных адъювантов (MPL и Quil-A) вызвали у мышей образование высоких титров антител, специфичных к КП (69), при этом фагоцитарная активность полученных антител находилась в пря-

мой зависимости от величины титров антител к КП серотипа 14 (69). Было специально показано, что сыворотки, не содержащие антител, специфичных к полисахариду (69), не проявили никакой фагоцитарной активности в отношении пневмококков серотипа 14. По результатам сравнительных экспериментов были сделаны выводы, что тетрасахаридный лиганд в составе конъюгата (70b) содержит эпитопы, необходимые для выработки защитных антител, и является минимальным структурным мотивом для выработки опсонизирующих антител к повторяющемуся звену КП (69) [130]. В случае, если антитела к конъюгату (70b) будут обладать также и протективными свойствами в экс-

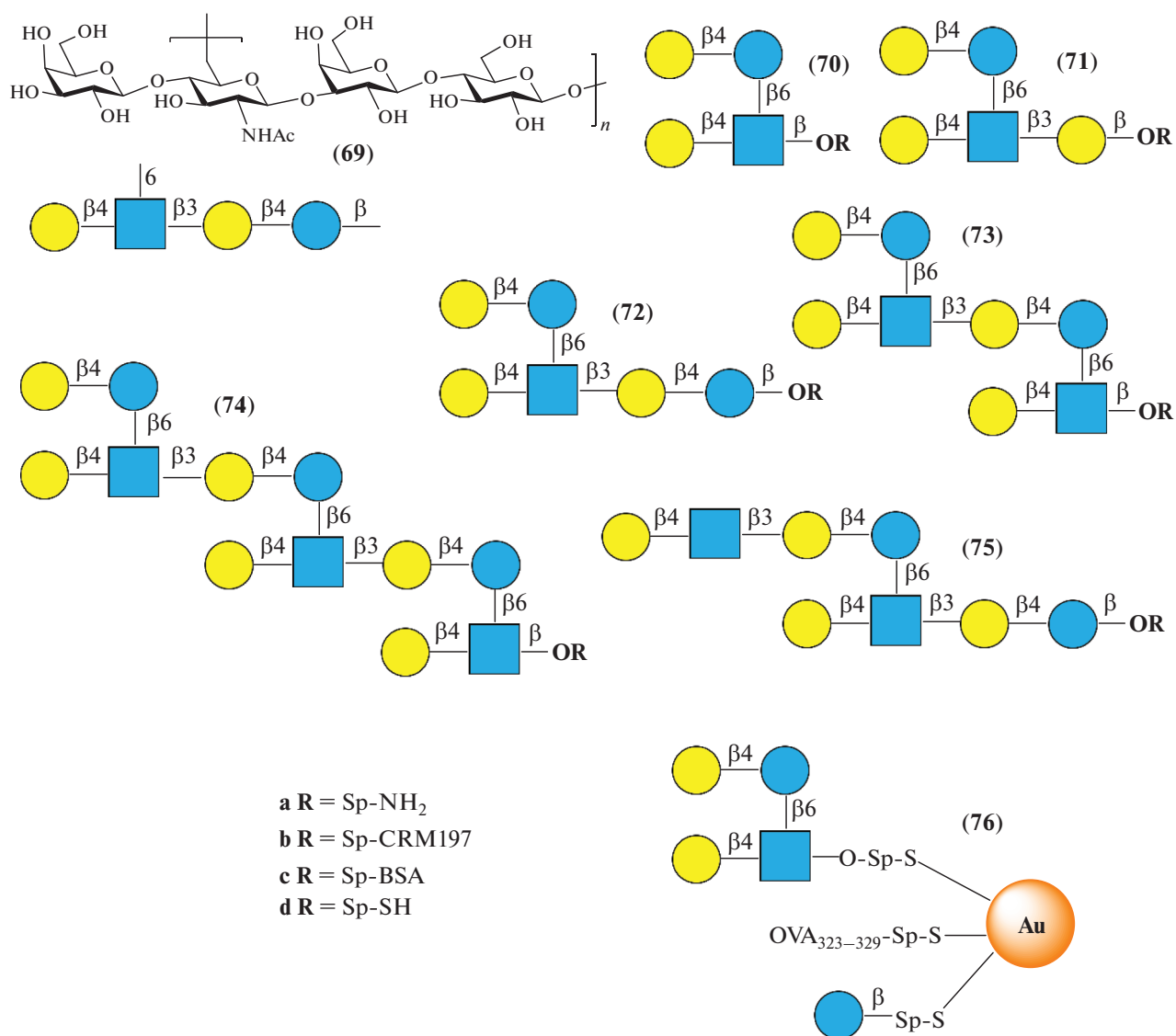


Рис. 11. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 14 (повторяющееся звено (69)), синтезированных родственных олигосахаридов (70a–75a) и конъюгатов (серии b–d и (76)).

периментах на животных, такой конъюгат можно будет рассматривать в качестве перспективного кандидата на роль соответствующего серотипу 14 компонента поливалентной пневмококковой вакцины.

При исследовании эффекта второй иммунизации мышам сначала вводили конъюгат (70b), а вторую иммунизацию проводили этим же гликоконъюгатом или неконъюгированным бактериальным КП (69). В 1-й день после повторного введения конъюгированного тетрасахарида в сыворотке крови мышей повышался уровень ИЛ-5, а на 7-е сутки появлялись специфические IgG-антитела в высоком титре. После иммунизации КП (69) не отмечали повышения уровня ИЛ-5 и антител к КП. В опытах *in vitro* стимуляция спленоцитов

конъюгатом (70b) приводила к продукции ИЛ-4 и ИЛ-5, что не отмечали при иммунизации неконъюгированным КП (69). Однако при стимуляции спленоцитов мышей, двукратно иммунизированных инактивированными клетками *S. pneumoniae* серотипа 14, уровень ИФН γ и ИЛ-17 был выше при иммунизации бактериальным КП, чем у мышей, повторно иммунизированных конъюгатом синтетического тетрасахарида, и у неиммунизированных мышей. Это позволило заключить, что после второй иммунизации конъюгированным тетрасахаридом (70b) происходит активация клеток памяти и формируется выраженный иммунитет к *S. pneumoniae* серотипа 14, тогда как повторная иммунизация конъюгированным бактериальным КП не приводит к образованию опсонизирующих анти-

тел, хотя и участвует в определенных регуляторных иммунологических механизмах [131].

Авторами данного обзора были получены и исследованы конъюгаты (70c), (72c) и (75c) [127, 128]. Способность иммунных сывороток мышей к конъюгатам тетра- (70c) и октасахарида (75c) индуцировать опсонофагоцитоз убитых нагреванием клеток *S. pneumoniae* серотипа 14 была выше, чем активность антисывороток к конъюгированному гексасахариду (72c). Впервые защитная активность BSA-гликоконъюгатов, адсорбированных на гидроксиде алюминия, была продемонстрирована на модели септической пневмококковой инфекции у мышей, зараженных *S. pneumoniae* серотипа 14. Наибольшую защитную активность проявлял конъюгат (70c), меньшую – конъюгат (75c), а наименьший защитный эффект получен при иммунизации конъюгатом (72b). После инокуляции неиммунизированным мышам пуловых сывороток, полученных от мышей, иммунизированных самой высокой испытуемой дозой каждого гликоконъюгата, различий в пассивной защите мышей от инфекции в зависимости от гликоконъюгата обнаружено не было. Показано, что в ответ на вакцинацию мышей CRM197–КП (69b) происходило образование IgG1-антител к тетрасахариду (70a). Образование большого количества специфических антител к тетрасахариду (70a) и его защитные свойства подтверждают, что тетрасахарид (70a) является перспективным кандидатом для создания конъюгированной вакцины против заболеваний, вызванных *S. pneumoniae* серотипа 14 [127, 128].

Для оценки действия гликоконъюгатов на молекулярно-клеточном уровне был выбран конъюгат (72c) с синтетическим гексасахаридным лигандом. Показано, что иммунизация конъюгатом (72c) без адьюванта увеличивала количество TLR2-экспрессирующих клеток и индуцировала созревание дендритных клеток (CD11c⁺, CD80⁺ и MHCII⁺), которые секретировали IL-1β, IL-6 и TNFα в культуральную среду. Уровень IL-1β, IL-10, IFNγ и TNFα в крови мышей повышался в течение 24 ч после однократного введения гликоконъюгата (72c) мышам. На 7-й день увеличивалось количество CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов в селезенке и В-лимфоцитов. Через 14 суток после второй иммунизации уровни CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов были ниже, чем в контроле, в то время как количество В-клеток, NK-клеток и MHCII-экспрессирующих клеток оставалось повышенным.

Добавление гидроксида алюминия к гликоконъюгату (72c) стимулировало выработку GM-CSF, IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFNγ и TNFα. Титры IgG1-антител к КП *S. pneumoniae* серотипа 14 через 7 дней после второй иммунизации гликоконъюгатом с адьювантом были высокими. В этот период сохранялись нормальные уровни

CD4⁺-Т-лимфоцитов в селезенке, тогда как наблюдалось снижение количества CD8⁺-Т-лимфоцитов и повышение уровня В-лимфоцитов, NK-клеток и клеток, экспрессирующих MHCII. Уровень IgG1-антител снижался к 92-му дню наблюдения. Бустерная иммунизация гликоконъюгатом (72c), адсорбированным на гидроксиде алюминия, стимулировала выработку IgG1-антител к КП, которые определялись в течение 97 дней. Выяснение специфических особенностей влияния синтетического гексасахаридного конъюгата (72c) на стимуляцию врожденного, клеточно-опосредованного иммунитета и антительного ответа может способствовать оптимизации конструкции гликоконъюгатной пневмококковой вакцины [129].

При создании синтетических вакцин против пневмококка также проводятся работы с использованием золотых нанокластеров в качестве носителей. В частности, были получены наночастицы (76) (рис. 11), несущие тетрасахаридный лиганд, являющийся повторяющимся звеном КП пневмококков серотипа 14 (69) [132]. Тетрасахарид (70d), содержащий терминальную тиольную группу для функционализации наночастицы, был конъюгирован вместе со стимулирующим Т-клетки пептидом (OVA_{323–329}) и D-глюкозным лигандом с образованием гибридных наночастиц (76) размером ~2 нм. Иммунологические исследования на мышах показали, что гликокластер (76) вызывает образование антител, специфичных к КП серотипа 14 (69). Полученные при иммунизации мышей наночастицами (76) антисыворотки были способны к опсонофагоцитозу пневмококков серотипа 14, однако менее эффективно, чем сыворотки мышей, иммунизированных конъюгатом бактериального КП (69) с CRM197.

***S. pneumoniae* серотипа 17F.** Капсулярный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 17F (77) (рис. 12) входит только в состав 23-валентных полисахаридных вакцин Pneumovaх 23® и Pneumo 23®. Его повторяющееся звено содержит семь моносахаридных остатков и имеет достаточно сложное строение, в результате чего первоначально определение структуры (77) было сделано с ошибками. На основе ошибочной структуры КП серотипа 17F были синтезированы олигосахаридные лиганды (78a–80a) [133] (рис. 12). Также были получены соответствующие конъюгаты (78b–80b), которые использовали для иммунизаций мышей и кроликов. Конъюгаты ди- (78b) и трисахарида (79b) у обоих видов животных вызывали образование антител, специфичных к КП серотипа 17F (77), а также защищали мышей от инфицирования инкапсулированными штаммами *S. pneumoniae* серотипа 17F в опытах по активной иммунизации. Конъюгат тетрасахарида (80b) не был способен индуцировать специфичных к КП антител, а также не проявлял защитных свойств. Позднее, ко-

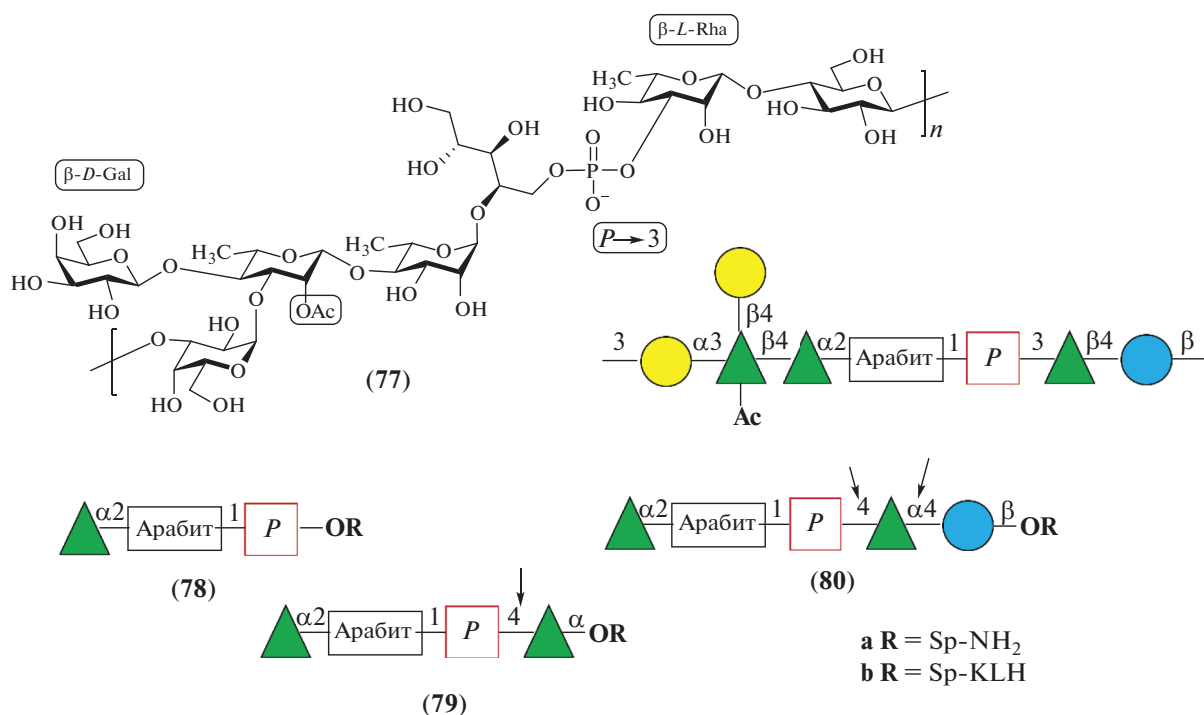


Рис. 12. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 17F (повторяющееся звено (77)), синтезированных родственных олигосахаридов (78а, 79а) и конъюгатов с КЛН (серия b).

гда структура КП серотипа 17F (77) была уточнена, стало понятно, что в структуре тетрасахаридного лиганда (80а) присутствовали две ошибки (указаны стрелками на схеме) по сравнению с правильной химической структурой (77). Для трисахаридного лиганда (79а) наличие одной ошибки не сыграло роли. Это позволило сделать вывод, что в дисахариде (78а) уже содержится ключевой протективный эпитоп [134]. Для проверки этого предположения, конечно, требуется проведение более детальных исследований.

***S. pneumoniae* серотипа 19F.** КП *S. pneumoniae* серотипа 19F (81) (рис. 13) входит в состав всех лицензированных пневмококковых вакцин. Был получен гликоконъюгатный нанокластер (83), который наряду с тетрасахаридным лигандом (70d) (отвечает серотипу 14) включает трисахаридный лиганд (82b), соответствующий повторяющемуся звену КП (81) [135]. При иммунизации мышей гликонаночастицами (83) были получены антитела, специфичные к КП серотипа 14 (69). При этом титры были более высокими, чем в случае частиц (76), содержащих только лиганд серотипа 14, однако выработки антител, специфичных к КП серотипа 19F, не наблюдали. Исследования в этом направлении продолжаются.

***S. pneumoniae* серотипа 23F.** КП пневмококков серотипа 23F (83) (рис. 14) построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев и входит в состав

23-валентных пневмококковых полисахаридных вакцин Pneumovax 23® и Pneumo 23®. Для поиска оптимального олигосахаридного лиганда, применимого в создании соответствующего вакцинного кандидата, были синтезированы трисахаридный (84а) и тетрасахаридный (85а) (соответствует полному повторяющемуся звену) лиганды, а также их конъюгаты с белком-носителем КЛН (84b, 85b) [136, 137] (рис. 14). Для анализа их иммуногенности использовался и конъюгат КЛН с КП серотипа 23F.

Результаты иммунизации кроликов и мышей показали существенные различия в иммуногенности конъюгатов. Так, у кроликов конъюгат с тетрасахаридом (85b) вызывал образование антител, специфичных к КП серотипа 23F (83), в то время как в экспериментах на мышах тот же самый конъюгат оказался совершенно неиммуногенным [137]. В свою очередь, конъюгат трисахарида (84b) оказался малоиммуногенным у кроликов и не вызывал образования антител, связывающихся с бактериальным КП (83). С помощью экспериментов с перекрестным ингибированием было показано, что антитела, индуцируемые у кроликов конъюгатами КП серотипа 23F (83b) и его полного повторяющегося звена (85b), обладают одинаковой эпитопной специфичностью, но отличаются по специфичности от антител человека, которые были получены в ответ на иммунизацию полисахари-

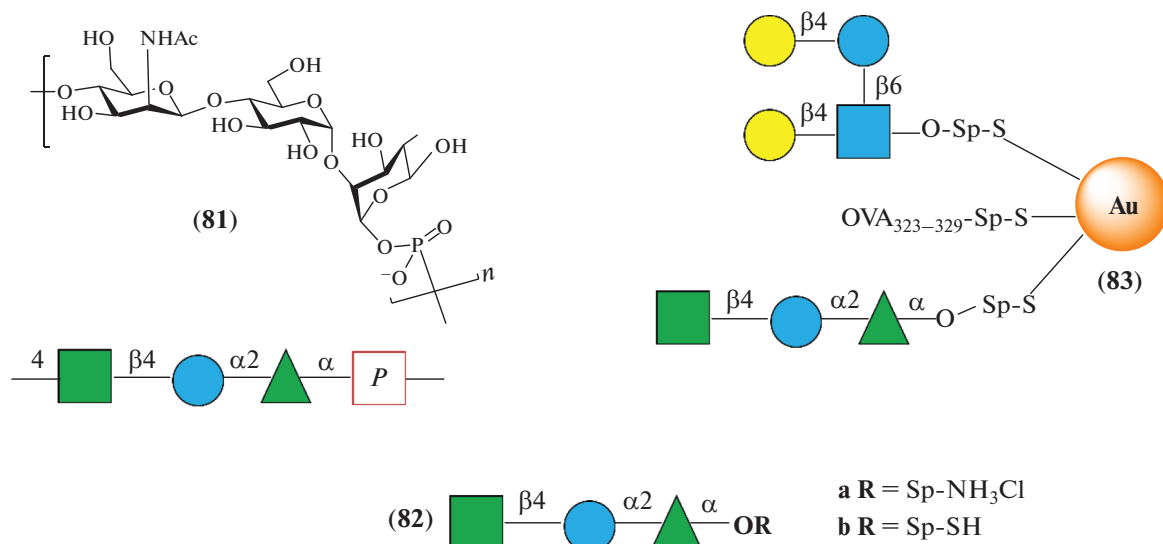


Рис. 13. Строение капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 19F (повторяющееся звено (81)), синтезированных родственных трисахаридных производных с агликоном-спейсером (82a, 82b) и гибридной наночастицы (83).

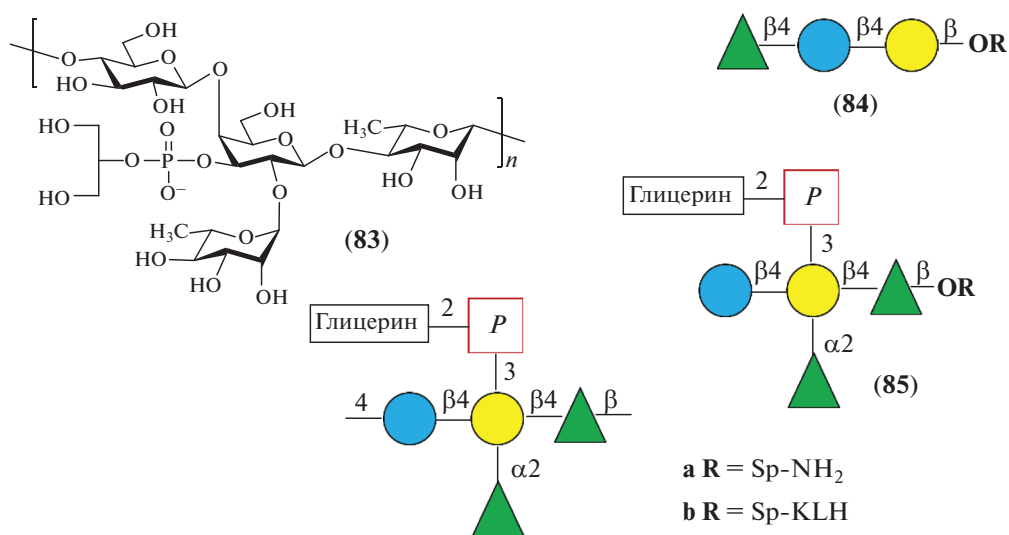


Рис. 14. Строение капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 23F (повторяющееся звено (83)), синтезированных родственных олигосахаридов (84a, 85a) и конъюгатов с KLN (серия b).

ридом (83) в составе коммерческой 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины [138].

Антисыворотки людей, иммунизированных КП (83), содержат высокие титры антител, связывающихся с КП серотипа 23F (83), однако это взаимодействие может лишь в незначительной степени быть проингибировано конъюгатами синтетических олигосахаридов (84b) и (85b). При этом рассматриваемая антисыворотка человека обладала в 5 раз более высокой опсонизирующей способностью в тестах *in vitro*, чем антисыворотка кролика к конъюгату полисахарида (83b). Сыво-

ротка кроликов, иммунизированных конъюгатом тетрасахарида (85b), в этих же тестах оказалась в 2 раза менее активной, чем антисыворотка к конъюгату полисахарида (83b). Антитела, индуцированные конъюгатом трисахаридов (84b), не вызвали опсонизации пневмококков серотипа 23F, что полностью согласуется с тем фактом, что антисыворотка к трисахаридному конъюгату (84b) не связывалась с нативным КП серотипа 23F (83) [138].

Результаты этой серии работ наглядно показывают, что иммуногенность, а также эпитопная специфичность иммунного ответа у различных

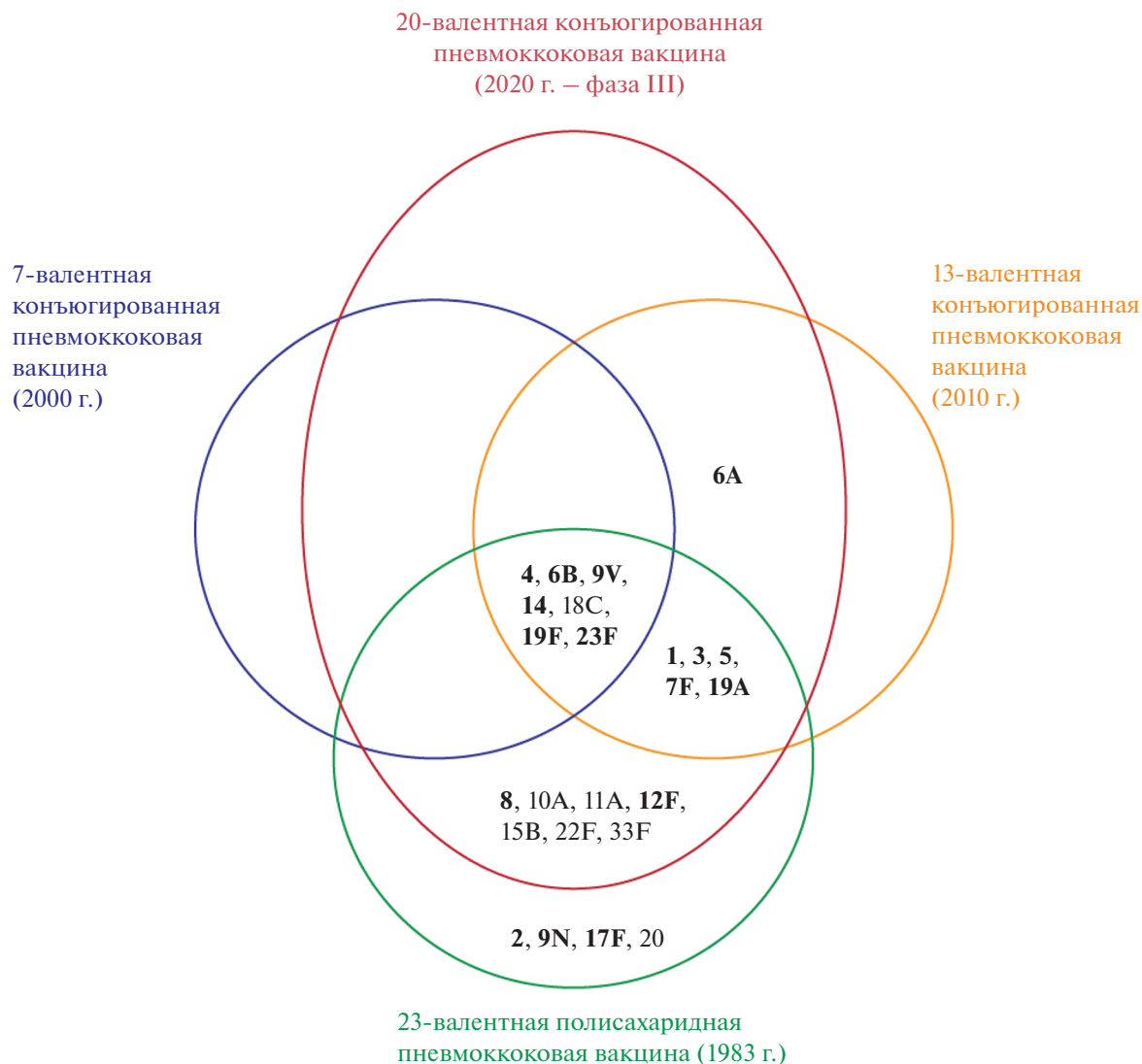


Рис. 15. Распределение серотипов в составе пневмококковых вакцин. Жирным шрифтом выделены рассмотренные в данном обзоре серотипы *S. pneumoniae*, для которых проводятся исследования с использованием синтетических олигосахаридных фрагментов, соответствующих капсулярным полисахаридам.

лабораторных животных и человека могут существенно отличаться. Авторы высказали предположение, что IgG человека способны распознавать эпитопы большего размера (в том числе конформационные эпитопы у крупных углеводных антигенов), в отличие от антител кролика, которые распознают эпитопы меньшего размера, присутствующие в том числе в коротких олигосахаридных лигандах. Поэтому для оценки эффективности вакцин необходимо проводить детальное изучение иммунного ответа у людей [138].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные в обзоре серотипы *S. pneumoniae* широко распространены во всех географических

регионах и относятся к числу серотипов пневмококка, наиболее часто вызывающих заболевания у детей и взрослых. Капсулярные полисахариды почти всех этих серотипов *S. pneumoniae* включены в состав лицензированных полисахаридных и конъюгатных пневмококковых вакцин. Однако, несмотря на эффективность используемых в настоящий момент вакцин, требуется постоянный контроль за распространением различных серотипов пневмококка и своевременное введение вакцинных препаратов, содержащих антигены для наиболее актуальных серотипов.

В настоящее время активно продолжается разработка полисахаридных конъюгированных вакцин, и компания Pfizer готовит к лицензированию 20-валентную вакцину (Pneumar 20[®], препарат про-

ходит третью фазу клинических испытаний), которая содержит конъюгаты полисахаридов семи дополнительных серотипов по сравнению с активно используемой в настоящее время вакциной Pnevnaq 13[®]. Распределение серотипов пневмококка в составе 7-, 13-, 20- и 23-валентных вакцинных препаратов суммировано на рис. 15.

Использование для получения конъюгированных вакцин полисахаридов, получаемых биотехнологическими методами, по-прежнему сопряжено с техническими сложностями. Среди рассмотренных в данном обзоре серотипов пневмококка многие КП содержат лабильные заместители или функциональные группы, которые модифицируются при выделении или в процессе конъюгации с белком-носителем, что ведет к искажению активных эпитопов и снижению иммуногенности соответствующих компонентов вакцины. Поэтому активно ведутся работы по синтезу фрагментов КП наиболее эпидемиологически актуальных серотипов и поиску эпитопов, ответственных за выработку защитных антител. Большой опыт исследований в этой области позволил создать определенные алгоритмы для эффективного отбора наиболее активных углеводных лигандов. Современные методы позволяют проводить автоматизированный скрининг углеводных лигандов, нанесенных на чипные слайды [54, 59, 62] и другие носители [139–145], для изучения эпитопной специфичности антител. Также были разработаны новые эффективные методы синтеза наиболее сложных типов олигосахаридов (см., например, работы [146–149]), в том числе автоматизированного синтеза олигосахаридов [150, 151], что существенно упрощает получение широких библиотек углеводных лигандов.

Проблемы, которые приходится решать при создании синтетических углеводных вакцин, во многом схожи со сложностями при разработке конъюгированных вакцин на основе бактериальных полисахаридов. Это и поиск оптимального метода конъюгации, и влияние связующего линкера на иммуногенность конъюгата, и правильный выбор адъюванта, а также несовпадение иммунных реакций на вводимые препараты у различных лабораторных животных и человека. Тем не менее в большинстве случаев удается найти нужные условия для создания высокоиммуногенных конъюгатов синтетических олигосахаридов, вызывающих образование защитных антител.

Иммунологически активные олигосахариды вызывают выработку антител к капсулярным полисахаридам и усиливают компонент-зависимый опсонофагоцитоз. Показано, что некоторые олигосахаридные конъюгаты вызывают даже более сильный антительный ответ, чем конъюгаты бактериальных КП отдельных серотипов. Это важное положение приводит к выводу о возможности

замены КП таких серотипов в коммерческих вакцинах на синтетические олигосахариды с созданием поливалентной синтетической пневмококковой вакцины. Так, уже известен удачный пример совместного применения 13-валентной конъюгированной вакцины и конъюгата синтетического олигосахариды, отвечающего фрагменту капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 8 [119]. Тем не менее сегодняшний уровень возможностей олигосахаридного синтеза позволяет получать фактически любые олигосахаридные производные, что позволит в достаточно скором времени создать пневмококковую вакцину только на основе синтетических олигосахаридных лигандов. Немаловажно и то, что оперирование такими производными лучше соответствует стандартам качества фармацевтического производства GMP как на этапе получения вакцинных лигандов, так и их конъюгатов с белками-носителями или иными функциональными компонентами, включая адъювантные гликолипиды [152].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-73-30017).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Henrichsen J.* // J. Clin. Microbiol. 1995. V. 33. P. 2759–2762. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.10.2759-2762.1995>
2. *Lund E., Henrichsen J.* // Methods in Microbiology / Eds. Bergan T., Norris J.R. Academic Press, London, United Kingdom, 1978. P. 241–262.
3. *Calix J.J., Nahm M.H.* // J. Infect. Dis. 2010. V. 202. P. 29–38. <https://doi.org/10.1086/653123>
4. *Alonso De Velasco E., Verheul A.F., Verhoef J., Snippe H.* // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P. 591–603.
5. *Rijkers G.T., Sanders L.A., Zegers B.J.* // Immunodeficiency. 1993. V. 5. P. 1–21.
6. *Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Siber G.R.* // Clin. Infect. Dis. 2000. V. 30. P. 100–121. <https://doi.org/10.1086/313608>
7. *Hausdorff W.P., Bryant J., Kloek C., Paradiso P.R., Siber G.R.* // Clin. Infect. Dis. 2000. V. 30. P. 122–140. <https://doi.org/10.1086/313609>

8. Hausdorff W.P., Yothers G., Dagan R., Kilpi T., Pelton S.I., Cohen R., Jacobs M.R., Kaplan S.L., Levy C., Lopez E.L., Mason E.O., Jr., Syriopoulou V., Wynne B., Bryant J. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2002. V. 21. P. 1008–1016.
<https://doi.org/10.1097/00006454-200211000-00007>
9. Hausdorff W.P. // *Eur. J. Pediatr.* 2002. V. 161 (Suppl. 2). P. S135–S139.
<https://doi.org/10.1007/s00431-002-1066-x>
10. Joffe M.D., Alpern E.R. // *Pediatr. Emerg. Care.* 2010. V. 6. P. 448–454.
<https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e3181e15e36>
11. Johnson H.L., Deloria-Knoll M., Levine O.S., Stoszek S.K., Freimanis Hance L., Reithinger R., Muenz L.R., O'Brien K.L. // *PLoS Med.* 2010. V. 7 (10). Article e1000348.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000348>
12. Athlin S., Kaltoft M., Slotved H.C., Herrmann B., Holmberg H., Bossen Konradsen H., Strålina K. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2014. V. 21. P. 1541–1549.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00259-14>
13. Littorin N., Udden F., Ahl J., Resman F., Slotved H.-C., Athlin S., Riesbeck K. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2746.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02746>
14. Hyams C., Yuste J., Bax K., Camberlein E., Weiser J.N., Brown J.S. // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. P. 716–725.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01056-09>
15. Melin M., Trzciński K., Antonio M., Meri S., Adegbola R., Kajjalainen T., Käyhty H., Väkeväinen M. // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. P. 5252–5261.
<https://doi.org/10.1128/iai.00739-10>
16. Melin M., Jarva H., Siira L., Meri S., Kayhty H., Väkeväinen M. // *Infect. Immun.* 2009. V. 77. P. 676–684.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01186-08>
17. Weinberger D.M., Harboe Z.B., Sanders E.A., Ndiritu M., Klugman K.P., Rückinger S., Dagan R., Adegbola R., Cutts F., Johnson H.L., O'Brien K.L., Scott J.A., Lipsitch M. // *Clin. Infect. Dis.* 2010. V. 51. P. 692–699.
<https://doi.org/10.1086/655828>
18. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper // 2007. V. 82. P. 93–104.
19. Pneumococcal vaccines – WHO position paper // *Wkly Epidemiol. Rec.* 2012. V. 87. P. 129–144.
20. Козлов П.С. // *МАКМАХ.* 2010. С. 25. [Kozlov R.S. // *Scientific and Practical Journal of the Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2010. P. 25.]
21. Козлов П.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А. // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2011. Т. 13. С. 177–187. [Kozlov R.S., Chagaryan A.N., Kozlova L.V., Muraviev A.A. // *Klin. Microbiol. Antimicrobial Chemotherapy.* 2011. V. 13. P. 177–187.]
22. Миронов К.О., Платонов А.Е., Козлов П.С. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2011. Т. 13. С. 104–113. [Mironov K.O., Platonov A.E., Kozlov R.S. // *Klin. Microbiol. Antimicrobial Chemotherapy.* 2011. V. 13. P. 104–113.]
23. Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Братусь Е.В., Перцева Т.А., Карпов И.А., Качанко Е.Ф. // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2013. Т. 15. С. 147–158. [Muravev A.A., Chagaryan A.N., Brothiers E.V., Pertseva T.A., Karpov I.A., Kachanko E.F. // *Klin. Microbiol. Antimicrobial Chemotherapy.* 2013. V. 15. P. 147–158.]
24. Alexandre C., Dubos F., Courouble C., Pruvost I., Varon E., Martinot A. // *Acta Paediatr.* 2010. V. 99. P. 1686–1690.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2010.01914.x>
25. Jamal F, Pit S., Isahak I., Abdullah N., Zainal Z., Abdullah R., Henrichsen J. // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1987. V. 18. P. 79–84.
26. Lin T.Y., Shah N.K., Brooks D., Garcia C.S. // *Vaccine* 2010. V. 48. P. 7589–7605.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.053>
27. McIntosh E.D., Fritzell B., Fletcher M.A. // *Epidemiol. Infect.* 2007. V. 135. N. 4. P. 644–656.
<https://doi.org/10.1017/S0950268806007199>
28. Rusen I.D., Fraser-Poberts M.D. // *Pediatr. Infect. Dis.* 1997. V. 16. P. 656–662.
<https://doi.org/10.1097/00006454-199707000-00007>
29. Jauneikaite E., Jefferies J.M., Hibberd M.L., Clarke S.C. // *Vaccine.* 2012. V. 30. P. 3503–3514.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.066>
30. Jansen W.T., Snippe H. // *Indian J. Med. Res.* 2004. V. 119. (Suppl). P. 7–12.
31. Butler J.C. // *Microb. Drug Resist.* 1997. V. 3. P. 125–129.
<https://doi.org/10.1089/mdr.1997.3.125>
32. CDC // *MMWR.* 1997. V. 46. No. RR-08. P. 1–24.
33. CDC // *MMWR.* 2008. V. 57. P. 1148–1151.
34. Inostroza J., Vinet A.M., Retamal G., Lorca, Ossa G., Facklam R.R., Sorensen R.U. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001. V. 8. P. 556–559.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.8.3.556-559.2001>
35. Akata K., Chang B., Yatera K., Kawanami T., Yamasaki K., Naito K., Noguchi S., Ishimoto H., Mukae H. // *J. Infect. Chemother.* 2015. V. 21. P. 723–728.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.07.002>
36. Chiba N. // *Jpn. J. Chemother.* 2011. V. 59. P. 561–572.
37. 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. // *Am. Geriatr. Soc.* 2014. V. 62. P. 1197–1198.
<https://doi.org/10.1111/jgs.12863>
38. Al-Jardani A., Al Rashdi A., Al Jaaidi A., Al Balushi M., Al Mahruqi S., Al-Abri S., Al-Maani A., Kumar R. // *Int. J. Infect. Dis.* 2019. V. 85. P. 135–140.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.05.027>
39. Lee S., Lee K., Kang Y., Bae S. // *Microb. Drug Resist.* 2010. V. 16. P. 135–142.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0114>
40. Coffey T., Derron S., Daniels M., Garcia-Leoni M.E., Cercenado E., Bouza E., Fenoll A., Spratt B.G. // *Microbiology.* 1996. V. 142. P. 2742–2757.
<https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2747>
41. España P.P., Uranga A., Ruiz L.A., Quintana J.M., Bilbao A., Aramburu A., Serrano L., Ayarza R., Marti-

- nez A.P., Zalacain R. // *Vaccine*. 2019. V. 37. P. 3840–3848.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.052>
42. Reinter R.R., Kaufhold A., Kuhnemund O., Luttichen R. // *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 1994. V. 281. P. 481–490.
43. Таточенко В.К., Катосова Л.К., Уланова М.А. // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 1994. С. 3–10. [Tatochenko V.K., Katosova L.K., Ulanova M.A. // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1994. P. 3–10.]
44. Белошицкий Г.В., Королева И.С. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014. Т. 1. С. 90–97. [Beloshitsky G.V., Koroleva I.S. // *Epidemiologia i Vaccinoprofylaktika*. 2014. V. 1. P. 90–97.]
45. Douglas R.M., Paton J.C., Duncan S.J., Hansman D.J. // *J. Infect. Dis.* 1983. V. 148. P. 131–137.
<https://doi.org/10.1093/infdis/148.1.131>
46. Thompson A., Lamberth E., Severs J., Scully I., Tarabar S., Ginis J., Jansen K.U., Gruber W.C., Scott D.A., Watson W. // *Vaccine*. 2019. V. 37. P. 6201–6207.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.048>
47. Nurkka A., Joensuu J., Henckaerts I., Peeters P., Poolman J., Kilpi T., Käyhty H.M. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004. V. 11. P. 1008–1014.
<https://doi.org/10.1097/01.inf.0000143640.03214.18>
48. Prymula R., Peeters P., Chrobok V., Kriz P., Novakova E., Kaliskova E., Kohl I., Lommel P., Poolman J., Prieels J.-P., Schuerman L. // *Lancet*. 2006. V. 367. P. 740–748.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68304-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68304-9)
49. Schuerman L., Prymula R., Chrobok V., Dieussaert I., Poolman J. // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 1953–1961.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.007>
50. Schuerman L., Prymula R., Henckaerts I., Poolman J. // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 1962–1968.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.008>
51. Shiramoto M., Hanada R., Juergens C., Shoji Y., Yoshida M., Ballan B., Cooper D., Gruber W.C., Scott D.A., Schmoele-Thoma B. // *Hum. Vaccine Immunother.* 2015. V. 11. P. 2198–2206.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1030550>
52. Simonsen V., Brandão A.P., Brandileone M.C.C., Yara T.I., Di Fabio J.L., Lopes M.H., Jacob Filho W. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005. V. 38. P. 251–260.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000200014>
53. Andrews N.J., Waight P.A., Burbidge P., Pearce E., Roalfe L., Zancolli M., Slack M., Ladhani S.N., Miller E., Goldblatt D. // *Lancet Infect. Dis.* 2014. V. 14. P. 839–846.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70822-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70822-9)
54. Schumann B., Anish C., Pereira C.L., Seeberger P.H. Chapter 3. Carbohydrate vaccines // *Biotherapeutics* / Eds. Jones L., McKnight A.J. Royal Society of Chemistry, 2013. P. 68–104.
55. Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. // *Успехи химии*. 2015. Т. 8. С. 1100–1113. [Gening M.L., Kurbatova E.A., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // *Rus. Chem. Rev.* 2015. V. 84. P. 1100–1113.]
<https://doi.org/10.1070/RCR4574>
56. Yu X.H., Sun Y., Frasch C., Concepcion N., Nahm M.H. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999. V. 6. P. 519–524.
57. van Dam J.E., Fleer A., Snippe H. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1990. V. 58. P. 1–47.
<https://doi.org/10.1007/BF02388078>
58. Kamerling J.P. Pneumococcal Polysaccharides: a Chemical View // *Streptococcus pneumoniae*, Molecular Biology and Mechanisms of Disease / Ed. Tomasz A. New York: Mary Ann Liebert, 1999. P. 81–114.
59. Kaplonek P., Khan N., Reppe K., Schumann B., Emmedi M., Lisboa M.P., Xu F.-F., Calow A.D.J., Parameswarappa S.G., Witzentrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. 13353–13358.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1811862115>
60. Jansen W.T., Hogenboom S., Thijssen M.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F., Verhoef J., Snippe H., Verheul A.F.M. // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. P. 787–793.
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.787-793.2001>
61. Benaissa-Trouw B., Lefeber D.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., Kraaijeveld K., Snippe H. // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. P. 4698–4701.
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4698-4701.2001>
62. Parameswarappa S.G., Reppe K., Geissner A., Ménová P., Govindan S., Calow A.D.J., Wahlbrink A., Weishaupt M.W., Monnanda B.P., Bell R.L., Pirofski L.-A., Suttorp N., Sander L.E., Witzentrath M., Pereira C.L., Anish C., Seeberger P.H. // *Cell Chem. Biol.* 2016. V. 23. P. 1407–1416.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.09.016>
63. Astronomo R.D., Burton D.R. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. V. 9. P. 308–324.
<https://doi.org/10.1038/nrd3012>
64. Schumann B., Reppe K., Kaplonek P., Wahlbrink A., Anish C., Witzentrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H. // *ACS Cent. Sci.* 2018. V. 4. P. 357–361.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00504>
65. Gessner B.D., Mueller J.E., Yaro S. // *BMC Infect. Dis.* 2010. V. 10. Article 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-22>
66. Poolman J., Frasch C., Nurkka A., Käyhty H., Bie-mans R., Schuerman L. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2011. V. 18. P. 327–336.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00402-10>
67. Schumann B., Pragani R., Anish C., Pereira C.L., Seeberger P.H. // *Chem. Sci.* 2014. V. 5. P. 1992–2002.
<https://doi.org/10.1039/C3SC53362J>
68. Wu X., Cui L., Lipinski T., Bundle D.R. // *Chem. Eur. J.* 2010. V. 16. P. 3476–3488.
<https://doi.org/10.1002/chem.201090046>
69. Christina A.E., van den Bos L.J., Overkleeft H.S., van der Marel G.A., Codee J.D.C. // *J. Org. Chem.* 2011. V. 76. P. 1692–1706.
<https://doi.org/10.1021/jo102363d>
70. Pfister H.B., Mulard L.A. // *Org. Lett.* 2014. V. 16. P. 4892–4895.
<https://doi.org/10.1021/ol502395k>
71. Emmadi M., Kulkarni S.S. // *Nat. Prod. Rep.* 2014. V. 31. P. 870–879.
<https://doi.org/10.1039/C4NP00003J>
72. Goldblatt D., Plikaytis B.D., 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 M.H., Raab J., Romero-Steiner S., Rose C., Schmidt D., Stapleton J., Carlone G.M.* // Clin. Vaccine Immunol. 2011. V. 18. P. 1728–1736.
<https://doi.org/10.1128/CVI.05252-11>
73. *Emmadi M., Khan N., Lykke L., Reppe K., Parameswarappa S.G., Lisboa M.P., Wienhold S.M., Witzgenrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 14783–14791.
<https://doi.org/10.1021/jacs.7b07836>
74. *Gruber W.C., Scott D.A., Emini E.A.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2012. V. 1263. P. 15–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06673.x>
75. *Choi E.H., Zhang F., Lu Y.-J., Malleya R.* // Clin. Vaccine Immunol. 2016. V. 23. P. 162–167.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00591-15>
76. *Cartee R.T., Forsee W.T., Schutzbach J.S., Yother J.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 3907–3914.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.3907>
77. *Dillard J.P., Vandersea M.W., Yother J.* // J. Exp. Med. 1995. V. 181. P. 973–983.
<https://doi.org/10.1084/jem.181.3.973>
78. *Guidolin A., Morona J.K., Morona R., Hansman D., Paton J.C.* // Infect. Immun. 1994. V. 62. P. 5384–5396.
<https://doi.org/10.1128/IAI.62.12.5384-5396.1994>
79. *Kolkman M.A., Wakarchuk W., Nuijten P.J., van der Zeijst B.A.* // Mol. Microbiol. 1997. V. 26. P. 197–208.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5791940.x>
80. *Arrecubieta C., Lopez R., Garcia E.* // J. Exp. Med. 1996. V. 184. P. 449–455.
<https://doi.org/10.1084/jem.184.2.449>
81. *Moore M.R., Link-Gelles R., Schaffner W., Lynfield R., Lexau C., Bennett N.M., Petit S., Zansky S.M., Harrison L.H., Reingold A., Miller L., Scherzinger K., Thomas A., Farley M.M., Zell E.R., Taylor T.H., Jr., Pondo T., Rodgers L., McGee L., Beall B., Jorgensen J.H., Whitney C.G.* // Lancet Infect. Dis. 2015. V. 15. P. 301–309.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)71081-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)71081-3)
82. *Cartee R.T., Forsee W.T., Yother J.* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 4470–4479.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4470-4479.2005>
83. *Goebel W.F.* // J. Exp. Med. 1940. V. 72. P. 33–48.
<https://doi.org/10.1084/jem.72.1.33>
84. *Pichichero M.E., Porcelli S., Treanor J., Anderson P.* // Vaccine 1998. V. 16. P. 83–89.
[https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)00146-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00146-1)
85. *Laferrrière C.A., Sood R.K., de Muys J.M., Michon F., Jennings H.J.* // Vaccine. 1997. V. 15. P. 179–186.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00148-X)
86. *Lindblad E.B.* // Immunol. Cell Biol. 2004. V. 82. P. 497–505.
<https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01286.x>
87. *Reppe K., Tschernig T., Lührmann A., van Laak, V., Grote K., Zemlin M.V., Gutbier B., Müller H.C., Kursar M., Schutte H., Rosseau S., Pabst R., Suttorp N., Witzgenrath M.* // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2009. V. 40. P. 474–481.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0071OC>
88. *Witzgenrath M., Pache F., Lorenz D., Koppe U., Gutbier B., Tabeing C., Reppe K., Meixenberger K., Dorhoi A., Ma J., Holmes A., Trendelenburg G., Heimesaat M.M., Bereswill S., van der Linden M., Tschopp J., Mitchell T.J., Suttorp N., Opitz B.* // J. Immunol. 2011. V. 187. P. 434–440.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003143>
89. *Xiong C., Feng S., Qiao Y., Guo Z., Gu G.* // Chem. Eur. J. 2018. V. 24. P. 8205–8216.
<https://doi.org/10.1002/chem.201800754>
90. *Pereira C.L., Geissner A., Anish C., Seeberger P.H.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. V. 54. P. 10016–10019.
<https://doi.org/10.1002/anie.201504847>
91. *Geissner A., Pereira C.L., Leddermann M., Anish C., Seeberger P.H.* // ACS Chem. Biol. 2016. V. 11. P. 335–344.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00768>
92. *Ginsburg A.S., Alderson M.R.* // Drugs Today (Barc). 2011. V. 47. P. 207–214.
<https://doi.org/10.1358/dot.2011.47.3.1556471>
93. *Ravenscroft N., Costantino P., Talaga P., Rodriguez R., Egan W.* // Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control (eBook). Springer. 2015. P. 301–381.
94. *Cipollo J.F.* // 2009 Review of Manufacturing Process – Prevnar13 [Pneumococcal 13-Valent Conjugate Vaccine (Diphtheria CRM197 protein)] (Food Agric Org, Rome). Available at <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/Approved-Products/UCM570727.zip>. Accessed September 22, 2017.
95. *Lisboa M.P., Khan N., Martin C., Xu F.-F., Reppe K., Geissner A., Govindan S., Witzgenrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 11063–11068.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1706875114>
96. *Sucher A.J., Chahine E.B., Nelson M., Sucher B.J.* // Ann. Pharmacother. 2011. V. 45. P. 1516–1524.
<https://doi.org/10.1345/aph.1Q347>
97. *Khatun F., Stephenson R.J., Toth I.* // Chemistry. 2017. V. 23. P. 4233–4254.
<https://doi.org/10.1002/chem.201603599>
98. *Dagan R., Poolman J., Siegrist C.-A.* // Vaccine. 2010. V. 28. P. 5513–5523.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.026>
99. *Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C.J., Jr.* // Infect. Dis. 1979. V. 140. P. 979–983.
<https://doi.org/10.1093/infdis/140.6.979>
100. *Siber G.R.* // Science. 1994. V. 265. P. 1385–1387.
<https://doi.org/10.1126/science.8073278>
101. *Breiman R.F., Butler J.C., Tenover F.C., Elliott J.A., Facklam R.R.* // JAMA. 1994. V. 271. P. 1831–1835.
102. *Novak R., Henriques B., Charpentier E., Normark S., Tuomanen E.* // Nature. 1999. V. 399. P. 590–593.
<https://doi.org/10.1038/21202>
103. *Parkinson A.J., Davidson M., Fitzgerald M.A., Bullock L.R., Parks D.J.* // J. Infect. Dis. 1994. V. 170. P. 461–464.
<https://doi.org/10.1093/infdis/170.2.461>
104. *Borgono J.M., Mclean A.A., Vella P.P.* // Proc. Soc. Biol. Med. 1978. V. 157. P. 148–154.
<https://doi.org/10.3181/00379727-157-40010>
105. *Kim H.W., Lee S., Kim K.-H.* // Medicine (Baltimore). 2016. V. 95. P. e4854.
106. *Lee H., Cha J.H., Nahm M.H., Burton R.L., Kim K.H.* // BMC Infect. Dis. 2013. V. 13. P. e474.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-474>
107. *Kim K.H.* // Korean J. Pediatr. 2005. V. 48. P. 506–551.
108. *Park I.H., Geno K.A., Yu J., Oliver M.B., Kim K.H., Nahm M.H.* // Clin. Vaccine Immunol. 2015. V. 22.

- P. 313–318.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00647-14>
109. Peeters C.C.A.M., Evenberg D., Hoogerhout P., Kayhty H., Saarinen L., van Boeckel C.A.A., van der Marel G.A., van Boom J.H., Poolman J.T. // *Infect. Immun.* 1992. V. 60. P. 1826–1833.
<https://doi.org/10.1128/IAI.60.5.1826-1833.1992>
110. Pozsgay V., Chu C., Pannell L., Wolfe J., Robbins J.B., Schneerson R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 5194–5197.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5194>
111. Thijssen M.J.L., Bijkerk M.H.G., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. // *Carbohydr. Res.* 1998. V. 306. P. 111–125.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(97\)10013-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(97)10013-1)
112. Thijssen M.J.G., Halkes K.M., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. // *Bioorg. Med. Chem.* 1994. V. 2. P. 1309–1317.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(00\)82081-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)82081-7)
113. Thijssen M.J.G., van Rijswijk M.N., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. // *Carbohydr. Res.* 1998. V. 306. P. 93–109.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(97\)00271-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(97)00271-1)
114. Parameswar A.R., Park I.H., Saksena R., Kováč P., Nahm M.H., Demchenko A.V. // *ChemBioChem.* 2009. V. 10. P. 2893–2899.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200900587>
115. Parameswar A.R., Pornsuriyasak P., Lubanowski N.A., Demchenko A.V. // *Tetrahedron.* 2007. V. 63. P. 10083–10091.
<https://doi.org/10.1016/j.tet>
116. Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E., Kurbatova E.A. // *J. Carbohydr. Chem.* 2018. V. 37. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1080/07328303.2017.1420797>
117. Ménová P., Sella M., Sellrie K., Pereira C.L., Seeberger P.H. // *Chem. Eur. J.* 2018. V. 24. P. 4181–4187.
<https://doi.org/10.1002/chem.201705379>
118. Ardanuy C., de la Campa A.G., García E., Fenoll A., Calatayud L., Cercenado E., Pérez-Trallero E., Bouza E., Liñares J. // *Emerg. Infect. Dis.* 2014. V. 20. P. 1848–1856.
<https://doi.org/10.3201/eid2011.131215>
119. Schumann B., Hahm H.S., Parameswarappa S.G., Reppe K., Wahlbrink A., Govindan S., Kaplonek P., Pirofski L.A., Witzentrath M., Anish C., Pereira C.L., Seeberger P.H. // *Sci. Transl. Med.* 2017. V. 9. Article eaaf5347.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf5347>
120. McNeely T.B., Staub J.M., Rusk C.M., Blum M.J., Donnelly J.J. // *Infect. Immun.* 1998. V. 66. P. 3705–3710.
<https://doi.org/10.1128/iai.66.8.3705-3710.1998>
121. Lee C.-J., Karpas A., Wang T.R., Kosaka T., Koizumi K. // *Microbiol. Immunol.* 1996. V. 40. P. 857–865.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1996.tb01151.x>
122. Parameswarappa S.G., Pereira C.L., Seeberger P.H. // *Beilstein J. Org. Chem.* 2020. V. 16. P. 1693–1699.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.16.140>
123. Seeberger P.H., Claney L., Govindan P., Govindan S. // *Beilstein J. Org. Chem.* 2017. V. 13. P. 164–173.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.13.19>
124. Mekada E., Uchida T. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 12148–12153.
125. Kochetkov N.K., Nifant'ev N.E., Backinowsky L.V. // *Tetrahedron.* 1987. V. 43. P. 3109–3121.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86852-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86852-6)
126. Crane D.T., Bolgiano B., Jones C. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 246. P. 320–327.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00320.x>
127. Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Nifantiev N.E. // *Pure Appl. Chem.* 2017. V. 89. P. 1403–1411.
<https://doi.org/10.1515/pac-2016-1123>
128. Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Akhmatova E.A., Egorova N.B., Yastrebova N.E., Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Nifantiev N.E. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. Article 659.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00659>
129. Akhmatova N.K., Kurbatova E.A., Akhmatov E.A., Egorova N.B., Logunov D.Y., Gening M.L., Nifantiev N.E. // *Front. Immunol.* 2016. V. 7. Article 248.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00248>
130. Safari D., Dekker H.A., Joosten J.A., Michalik D., de Souza A.C., Adamo R., Lahmann M., Sundgren A., Oscarson S., Kamerling J.P. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. P. 4615–4623.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00472-08>
131. Safari D., Dekker H.A., de Jong B., Rijkers G.T., Kamerling J.P., Snippe H. // *Vaccine.* 2011. V. 29. P. 6498–6504.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.013>
132. Safari D., Marradi M., Chiodo F., Th Dekker H.A., Shan Y., Adamo R., Oscarson S., Rijkers G.T., Lahmann M., Kamerling J.P. // *Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 651–662.
<https://doi.org/10.2217/nnm.11.151>
133. Alonso de Velasco E., Verheul A.F., Veeneman G.H., Gomes L.J., van Boom J.H., Verhoef J., Snippe H. // *Vaccine.* 1993. V. 11. P. 1429–1436.
[https://doi.org/10.1016/0264-410x\(93\)90172-t](https://doi.org/10.1016/0264-410x(93)90172-t)
134. Jansen W.T.M., Verheul A.F., Veeneman G.H., van Boom J.H., Snippe H. // *Vaccine.* 2002. V. 20. P. 19–21.
[https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00263-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00263-8)
135. Vetro M., Safari D., Fallarini S., Salsabila K., Lahmann M., Penadés S., Lay L., Marradi M., Compstella F. // *Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 13–23.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0306>
136. van Steijn A.M., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. // *Carbohydr. Res.* 1991. V. 211. P. 261–277.
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)80096-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)80096-6)
137. van Steijn A.M., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. // *J. Carbohydr. Chem.* 1992. V. 11. P. 665–689.
<https://doi.org/10.1080/07328309208020085>
138. Alonso de Velasco E., Verheul A.F.M., van Steijn A.M.P., Dekker H.A.T., Feldman R.G., Fernández I.M., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., Verhoef J., Snippe H. // *Infect. Immun.* 1994. V. 62. P. 799–808.
<https://doi.org/10.1128/IAI.62.3.799-808.1994>
139. Hyun J. Y., Pai J., Shin I. // *Acc. Chem. Res.*, 2017. V. 50. P. 1069–1078.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00043>
140. Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Beau R., Aimaniana V., Latgé J.-P., Nifantiev N.E. // *Chem. Eur. J.* 2015. V. 21. P. 1029–1035.
<https://doi.org/10.1002/chem.201404770>
141. Крылов В.Б., Петрук М.И., Григорьев И.В., Лебедин Ю.С., Глушко Н.И., Халдеева Е.В., Аргунов Д.А., Хатунцева Е.А., Топлишек М.В., Комарова Б.С.,

- Карелин А.А., Юдина О.Н., Меньшов В.М., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. // Биорг. химия. 2018. Т. 44. С. 78–86. [Krylov V.B., Petruk M.I., Grigoryev I.V., Lebedin Y.S., Glushko N.I., Khaldeeva E.V., Argunov D.A., Khatuntseva E.A., Toplishek M.V., Komarova B.S., Karelin A.A., Yudina O.N., Menshov V.M., Yashunskii D.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 80–89.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162017060073>
142. Argunov D.A., Trostianetskaia A.S., Krylov V.B., Kurbatova E.A., Nifantiev N.E. // Eur. J. Org. Chem. 2019. V. 2019. P. 4226–4232.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201900389>
143. Laverde D., Romero-Saavedra F., Argunov D.A., Enotari J., Krylov V.B., Kalfopoulou E., Martini C., Torelli R., van der Marel G.A., Sanguinetti M., Codée J.D.C., Nifantiev N.E., Huebner J. // ACS Infect. Dis. 2020. V. 6. P. 1816–1826.
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00063>
144. Matveev A.L., Krylov V.B., Emelyanova L.A., Solovov A.S., Khlusevich Y.A., Baykov I.K., Fontaine T., Latgé J.-P., Tikunova N.V., Nifantiev N.E. // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0193938.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193938>
145. Krylov V.B., Nifantiev N.E. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2020, V. 425. P. 1–16.
https://doi.org/10.1007/82_2019_187
146. Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // Chem. Rec. 2016. V. 16. P. 488–506.
<https://doi.org/10.1002/tcr.201500245>
147. Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // Carbohydr. Res. 2014. V. 384. P. 70–86.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.11.016>
148. Krylov V.B., Argunov D.A., Vinnitskiy D.Z., Verkhnyatskaya S.A., Gerbst A.G., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Huebner J., Holst O., Siebert H.-C., Nifantiev N.E. // Chem. Eur. J. 2014. V. 20. P. 16516–16522.
<https://doi.org/10.1002/chem.201405083>
149. Токачлы А.И., Винницкий Д.З., Устюжанина Н.Е., Нифантьев Н.Э. // Биорг. химия. 2021. Т. 47. С. 57–75. [Tokatly A.I., Vinnitskiy D.Z., Ustyuzhanina N.E., Nifantiev N.E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 52–68.]
<https://doi.org/10.31857/S0132342321010255>
150. Pardo-Vargas A., Delbianco M., Seeberger P.H. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2018. V. 46. P. 48–55.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.007>
151. Louçano J., Peter B., Marchesi A., del Bino L., Adamo R., Flitsch S., Salwiczek M. // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 23668–23674.
<https://doi.org/10.1039/d0ra01803a>
152. Cavallari M., Stallforth P., Kalinichenko A., Rathwell D.C.K., Gronewold T.M.A., Adibekian A., Mori L., Landmann R., Seeberger P.H., De Libero G. // Nature Chem. Biol. 2014. V. 10. P. 950–956.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1650>

Synthetic Analogues of Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* and Immunogenic Activities of Glycoconjugates Thereof

M. L. Gening*, E. A. Kurbatova**, and N. E. Nifantiev*.,#

Phone/fax: +7 (490) 135-87-84; e-mail: nen@ioc.ac.ru

*N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Leninskij prospekt 47, Moscow, 119991 Russia

**Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, ul. Malyj Kazennyj per. 5a, Moscow, 105064 Russia

Streptococcus pneumoniae is a cause of severe diseases in adults and children. It was found that some capsule polysaccharides of clinically significant pneumococcal serotypes have low immunogenicity as part of commercial polysaccharide and conjugated pneumococcal vaccines. The review considers methods for obtaining and structural features of synthetic oligosaccharides of problematic pneumococcal serotypes characterized by low immunogenicity due to destruction or undesirable modification in the process of their preparation and purification; serotypes that cause severe pneumococcal diseases, as well as serotypes that are not part of conjugated pneumococcal vaccines. It is shown that synthetic oligosaccharides corresponding to protective glycotopes of capsular polysaccharides of various pneumococcal serotypes induce the formation of protective opsonizing antibodies and immunological memory. Optimal designs of oligosaccharides of epidemiologically significant pneumococcal serotypes that can be used to develop synthetic vaccines and diagnostic test systems to prevent and detect infections *S. pneumoniae* and monitor the vaccination efficiency which described in present review.

Keywords: pneumococci, vaccine, oligosaccharide, ligand, immunogen, antibodies, opsonophagocytosis, protective activity