

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 578.834.1:615.3

СПОСОБ СОЗДАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ЭНТЕРОКОККА L3-SARS НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ШТАММА ENTEROCOCCUS FAECIUM L3

Бормотова Е. А., Гупалова Т. В., Суворов А. Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Научно-образовательный центр «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Бормотова Елена Алексеевна,
НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия
микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр
персонализированной медицины» ФГБНУ
«ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-Петербург,
Россия, 197376.
bormotovae@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 05.12.2022
и принята к печати 23.12.2022.

РЕЗЮМЕ

Современная пандемия, вызванная вирусом SARS-Cov-2, существенно повлияла на появление новых инъекционных вакцин, обеспечивающих преимущественно специфический IgG-ответ. Однако общепризнано, что защита от патогенов на поверхности слизистых оболочек, первой преграде на пути проникновения вируса, преимущественно зависит от IgA-ответа. В настоящее время известно, что использование генетически модифицированных микроорганизмов, в том числе пробиотиков, позволяет доставлять терапевтические молекулы через полость рта или носа, вызывая иммунный ответ на слизистых оболочках. Штаммы пробиотиков хорошо исследованы на предмет безопасности для организма, могут сохранять жизнеспособность после прохождения желудочного барьера, улучшают межэпителиальные связи, а также могут генерировать ряд поверхностных структур, усиливающих эффективность вакцинации.

Рекомбинантные пробиотические микроорганизмы, способные продуцировать вакцинные антигены посредством встраивания специфических фрагментов ДНК в их геном, являются одной из перспективных платформ, которые можно использовать для разработки соответствующей вакцины, содержащей специфический антиген для быстрой реакции на вирусные мутации. В данном исследовании мы представляем создание нового кандидата на вакцину против SARS-Cov-2 с использованием фрагмента гена *S1* SARS-Cov-2. В выбранной последовательности произвели замены трех аминокислот, в соответствии с имеющимися данными о мутациях новых вариантов SARS-Cov-2. Этот фрагмент ДНК был вставлен в рамку гена главного белка пилей с доменом d2 энтерококкового оперона, кодирующего пили.

Ключевые слова: вакцины, пробиотики, энтерококк, COVID-19, SARS-Cov-2, S белок.

Для цитирования: Бормотова Е.А., Гупалова Т.В., Суворов А.Н. Способ создания рекомбинантного штамма энтерококка L3-SARS на основе биологически активного штамма *Enterococcus faecium* L3. Российский журнал персонализированной медицины. 2023;3(1):64-71. DOI: 10.18705/2782-3806-2023-3-1-64-71.

METHOD FOR CREATING A RECOMBINANT STRAIN OF ENTEROCOCCUS L3-SARS BASED ON BIOLOGICALLY ACTIVE STRAIN ENTEROCOCCUS FAECIUM L3

Bormotova E. A., Gupalova T. V., Suvorov A. N.

Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Bormotova Elena A.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197376.
bormotovae@rambler.ru

Received 05 December 2022; accepted
23 December 2022.

ABSTRACT

The current pandemic caused by the SARS-Cov-2 virus has significantly influenced the emergence of new injectable vaccines that provide a predominantly specific IgG response. However, it is generally accepted that protection against pathogens at the mucosal surface, which is the first barrier to viral entry, is predominantly dependent on the IgA response. It is now widely accepted that the use of genetically modified microorganisms, including probiotics, allows the oral or nasal mucosal delivery of therapeutic molecules, inducing an immune response in the mucous membranes. Probiotic strains are well studied for safety for the organism and are able to remain viable after passing through the gastric barrier, improve intraepithelial connections, and can generate a number of surface expressed molecules that enhance the effectiveness of vaccination.

Recombinant probiotic microorganisms capable of producing vaccine antigens by inserting specific DNA fragments into their genome are one of the potential platforms that can be used to develop an appropriate vaccine containing a specific antigen for rapid response to viral mutations. Here, we demonstrate the construction of a novel SARS-Cov-2 vaccine candidate employing the gene fragment of S1 SARS-Cov-2 gene. According to the available data on new

variants of SARS-Cov-2 mutations, three amino acid substitutions were made in the chosen sequence. This DNA fragment was inserted in frame into major pili protein gene within d2 domain of enterococcal operon encoding for pili.

Key words: COVID-19, enterococcus, probiotic, SARS-CoV-2, S protein, vaccines.

For citation: Bormotova EA, Gupalova TV, Suvorov AN. Method for creating a recombinant strain of enterococcus L3-SARS based on biologically active strain Enterococcus faecium L3. Russian Journal for Personalized Medicine. 2023;3(1):64-71. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2023-3-1-64-71.

ВВЕДЕНИЕ

Эпоха вакцинации, открытая Эдвардом Дженером в конце XVIII века, драматическим образом изменила лицо мировой медицины, начав эру профилактики. Идея использовать в качестве защиты от возможной инфекции измененные бактерии или вирусы, способные при введении в организм стимулировать образование специфических антител и цитотоксических клеток, вызывающих инактивацию патогенов, оказалась плодотворной и в существенной степени помогла снизить заболеваемость и смертность от инфекций. Однако появление новой коронавирусной инфекции (COVID-19), охватившей все континенты, за считанные недели показало, что современная наука к началу эпидемии была совершенно не готова воспрепятствовать данному вирусу: на 9 ноября 2022 года во всем мире зарегистрировано 637 млн случаев заболевания, приведших к 6,6 млн смертей.

В невероятно сжатые сроки были разработаны вакцины против SARS-Cov-2, основанные на самых различных принципах: субъединичные белковые вакцины, РНК-вакцины, реплицирующиеся и нереплицирующиеся вирусные векторные вакцины, инактивированные вакцины, ДНК-вакцины, вакцины с вирусоподобными частицами и живые аттенуированные вакцины [2]. Абсолютное большинство этих вакцин — инъекционные, обеспечивающие специфический иммунный ответ с выработкой иммуноглобулинов класса G, циркулирующих в крови. Таким образом, защитный вакцинальный эффект проявляется только после проникновения вируса через слизистые барьеры в легких и бронхиальном дереве. Альтернативой инъекционных вакцин являются мукозальные вакцины, направленные на выработку специфических иммунных реакций непосредственно в воротах ин-

фекции — слизистых оболочках ротовой полости и верхних дыхательных путей.

Использование пробиотических векторов, несущих вирусные компоненты, является одним из перспективных подходов к созданию вакцин для слизистых оболочек. Ранее в наших исследованиях было описано конструирование живой вакцины L3-COVID-19 против коронавирусной инфекции SARS-Cov-2 на основе пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3 [1]. Исследования показали, что пероральный прием данного вакцинного кандидата обеспечивал формирование протективного иммунитета против SARS-Cov-2. Задачей данной работы стало создание варианта пробиотической вакцины, направленной на защиту от новых штаммов коронавируса SARS-Cov-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные культуры

В качестве реципиентов для трансформации из коллекции Института экспериментальной медицины и были получены и использованы штаммы *Enterococcus faecium* L3 и *Escherichia coli* DH5a и M15. Штаммы *E. coli* выращивали в среде Лури-а-Бертрани (LB) (Oxoid, США) при 37 °C при постоянном перемешивании. *E. faecium* L3 и его производные выращивали в бульоне Тодда Хьюитта (ТНВ) («Химедиа», Индия) при 37 °C в течение 14 ч. LB agar (Lennox L agar, Thermo Fisher Scientific) и в качестве твердой среды для культивирования, количественного определения бактерий и идентификации *E. faecium* L3 и устойчивых к эритромицину энтерококковых трансформантов использовали основу на дифференциальном агаре Тодда Хьюитта («Химедиа», Индия) без антибиотика и с 10 мкг/мл эритромицина.

Клонирование фрагмента гена *sarsS1*

Синтез фрагмента гена *sarsS1* и его клонирование в плазмидный вектор pAL2-T было осуществлено фирмой «Евроген» («Евроген», Россия). Для удобства последующего клонирования при синтезе во фрагмент гена *sarsS1* были вставлены сайты рестрикции для NdeI и EcoRI.

Получение рекомбинантного штамма *Enterococcus faecium* L3-SARS

Разработка и клонирование слитого гена *entF-sarsS1*

Для получения слитого гена *entF-sarsS1* и его клонирования были сконструированы ДНК-праймеры, представленные в таблице.

Слитый ген *entF-sarsS1* был получен с использованием рекомбинантной суицидальной плазмиды *pentF-pspf*, которую получили ранее для изготовления живой пробиотической пневмококковой вакцины (Guralova, et al., 2018). Для получения плазмидной ДНК *pentF-sarsS1* из плазмидной ДНК *pentF-pspf* вырезали вставку гена пневмококка *pspf*, проведя гидролиз *pentF-pspf* ферментами NdeI и EcoRI, которые фланкировали последовательность *pspf*. Полученный верхний фрагмент после гидролиза был использован для дальнейшего клонирования. Плазмидная ДНК pAL2-T, содержащая фрагмент гена *sarsS1*, была гидролизована ферментами NdeI и EcoRI. Продукты гидролиза эндонуклеазами были разделены с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, выделены из агарозы с использованием набора QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, США). Выделенные гидролизаты лигировали и трансформировали в гетерологичную систему *E. coli* DH5a с отбором трансформантов на среде с 500 мкг/мл эритромицина. Наличие вставки подтверждалось гидролизом плазмидных ДНК полученных клонов ферментами NdeI и EcoRI. Плазмиду *pentF-sarsS1* выделяли при помощи набора Mini-Prep (Qiagen, США) и использовали для электротрансформации энтерококков.

Трансформация энтерококка интегративной плазмидой *pentF-sarsS1* путем электропорации. Для электропорации *Enterococcus faecium* L3 выращивали в 3 мл среды Тодда-Хьюитта (ТНВ) («Химедиа», Индия) в течение ночи при 37 °С, инокулировали (2 %) в 50 мл среды ТНВ и выращивали до OD 600 = 0,3. Полученную культуру охлаждали на льду, трижды промывали 20 мл 10 % глицерина центрифугированием 3500g при 4 °С. Клеточный осадок суспендировали в 0,5 мл 10 % стерильного раствора глицерина, осаждали и суспендировали в 0,3 мл того же раствора. Электропорацию проводили в кюветах с расстоянием между электродами 1 мм, добавляли в общей сложности 50 мкл клеточной суспензии, при напряжении 2100 В.

К 50 мкл клеток добавляли 300 нг интегративной плазмиды *pentF-sarsS1*. Оптимальная длительность импульса составляла 4–5 мс. После выделения в кювету добавляли 1 мл среды ТНВ; бактериальную суспензию инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и наносили на ТНА 10 мкг/мл эритромицина. Через 24 часа контролировали появление трансформантов *Enterococcus faecium* L3-SARS.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка и клонирование слитого гена *entF-sarsS1*

Для клонирования была выбрана последовательность ДНК коронавируса размером 533 п.н., кодирующая полноразмерный рецептор-связывающий домен (RBD) белка S.

GCATTGCATATGGATTATTCTGTCCTATATA
ATCCGCATCATTTTCCACTTTTAAGTGTTATG
GAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGC
TTTACTAATGTCTATGCAGATTTCATTTGTAATT
AGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAG
GGCAAAGTGGAAAGATTGCTGATTATAATTA
TAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTA

Таблица. Олигонуклеотидные праймеры

Название	Ориентация	Нуклеотидная последовательность от 5' к 3'
CS1	прямой	TTGCATATGGATTATTCTGTCCTATATA
CS2	обратный	GTAGAATTCCAAATTAGTAGACTTTTTTA
CS3	обратный	GCCCTGGAGCGATTTGTCTGACTTCATC
B1	прямой	TGAGTGAACCACAGCCAGAA
Seq F	прямой	GGACACCACAACCATCGAAG

TAGCTTGGAACCTCTAACAATCTTGATTCTAAG
GTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATT
GTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGA
GAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGT
AGCACACCTTGTAATGGTGGTGAAGGTTTAA
TTGTTACTTTTCCTTTACAATCGTATGGTTTCCA
ACCCACTAATGGTGGTGGTTACCAACCATAACA
GAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATG
CACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCT
ACTAATTTGGAATTCTACGA

ALHMDYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLN
DLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIA
DYNKYLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGN
YNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTP
CNGVKGFNCFYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR
VVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLEFY

В выбранной последовательности, в соответствии с имеющимися данными о мутациях в RBD новых вариантов SARS-Cov-2 [3], произвели замены аминокислот:

- K417N (лизин-аспарагин), нуклеотид G изменили на C;
- E484K (глутаминовая кислота-лизин), нуклеотид G изменили на A;
- N501Y (аспарагин-тирозин), нуклеотид A изменили на T.

Для клонирования использовали синтезированную последовательность фрагмента гена *SarsSI*:

GCATTGCATATGGATTATTCTGTCCTATATA
ATTCCGCATCATTTTCCACTTTTAAAGTGTTATG
GAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCT
TTACTAATGTCTATGCAGATTCAATTTGTAATTA
GAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGG
CAAACCTGGAAACATTGCTGATTATAATTATAA
ATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGC
TTGGAACCTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGG
TGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAG
GAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATA
TTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACAC
CTTGTAATGGTGTAAAGGTTTAAATTGTTACT
TTCCTTTACAATCGTATGGTTTCCAACCCACTT
ATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAG
TACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAA
CTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGG
AATTCTACGA

ALHMDYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL
NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGNI
ADYNKYLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
NYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTP
CNGVKGFNCFYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR
VVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLEFY

Рекомбинантная плазмидная ДНК *pentF-sarsSI* была сконструирована, как описано в разделе «Разработка и клонирование слитого гена *entF-sarsSI*». В результате трансформации было получено 5 клонов. Гидролиз плазмидных ДНК, выделенных из полученных клонов, ферментами *NdeI* и *EcoRI* подтвердил наличие вставки во всех клонках. Полученную интегративную плазмиду *pentF-sarsSI* использовали для трансформации энтерококков методом электропорации.

В результате электропорации было получено 3 трансформанта. Из них выделили ДНК и проверили наличие вставки гена *SarsSI* в реакции ПЦР с праймерами CS1 и CS2. Положительный ответ дали 2 трансформанта. С помощью амплификации ДНК, выделенных из полученных клонов, с праймерами B1и CS2 была подтверждена интеграция плазмидной ДНК *pentF-sarsSI* в хромосомную ДНК энтерококков у обоих трансформантов.

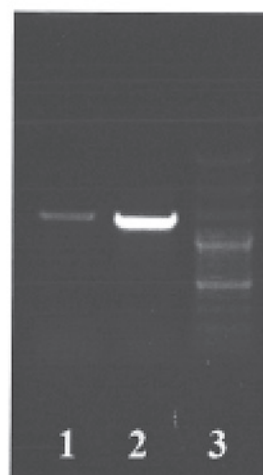


Рис. 1. Электрофореграмма амплифицированных ДНК-фрагментов с праймерами B1 и CS2

Примечание: 1, 2 — продукты ПЦР ДНК, полученных из 2 клонов; 3 — 100 п.н. ДНК маркер (сверху вниз: 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 нуклеотидных пар).

Плазмидную ДНК, выделенную из одного из положительных клонов, секвенировали с использованием ДНК-праймеров, соответствующих последовательности гена *SarsSI* (праймер CS3) и последовательности хромосомной ДНК энтерококков (праймер B1). Результаты секвенирования ДНК подтвердили интеграцию плазмидной ДНК *pentF-sarsSI* в хромосомную ДНК *Enterococcus faecium*.

Этот клон энтерококка был обозначен как L3-SarsS и выбран в качестве вакцинного кандидата для дальнейшего исследования.



Рис. 2. Схема интеграции плазмиды pT7ermB с *ent-sarsS1* в хромосому штамма *E. faecium* L3

Примечание: P — промотор гена d2; d2-1 — фрагмент гена d2, кодирующий N-терминальную часть белка D2; d2-2 представляет собой область гена d2, кодирующую центральную часть белка D2; sarsS1 — фрагмент гена sarsS1; d2-end представляет собой конец гена d2, кодирующего C-конец белка D2; pT7ermB — интегративная плазмида. Стрелки соответствуют открытым рамкам считывания в интегрированном элементе. Весь интегрированный элемент *ent-sarsS1* с плазмидой pT7ermB отмечен фигурной скобкой.

Схема конструирования энтерококкового клона представлена на рисунке 2.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время внедряются различные новые вакцины против COVID-19. Безопасность всех одобренных ВОЗ вакцин подтверждена клиническими испытаниями. Однако в последнее время появляется все больше данных о различных поствакцинальных осложнениях: миокардит [4], дисфункция щитовидной железы [5], тромботическая тромбоцитопения [6], неврологические расстройства [7], аллергические реакции [8], аутоиммунный гепатит и некоторые другие побочные эффекты были зарегистрированы после введения вакцин против COVID-19 [9]. Существенной проблемой, обусловившей столь разнообразные поствакцинальные осложнения, явилось использование разнообразных адъювантных препаратов.

Помимо побочных эффектов вакцинации в общей популяции существует также риск развития побочных реакций в таких группах риска, как беременные женщины, пожилые люди, лица с иммунными заболеваниями и синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), реципиенты трансплантатов и онкологические больные [10]. Хотя эффективность вакцинации в профилактике коронавируса бесспорна, важно работать над улучшением существующих препаратов и разработкой безопасных вакцин-кандидатов.

Одним из наиболее перспективных подходов к созданию вакцин для слизистых оболочек является использование пробиотических векторов, несущих вирусные компоненты. Этот подход способствует как формированию гуморального

иммунитета, так и усилению неспецифической активации иммунной системы благодаря иммуномодулирующим свойствам пробиотика [11]. Кроме того, как и другие живые вакцины, эти пробиотические препараты способствуют формированию клеточного компонента адаптивного иммунитета. Основным преимуществом живых мукозальных вакцин является активация всех компонентов иммунной системы, которая вызывает сбалансированный, сильный иммунный ответ непосредственно на слизистых оболочках. При этом, помимо специфического иммуноглобулина класса G на слизистых обнаруживается в первую очередь специфический иммуноглобулин класса A. Применение бактерий пробиотиков (вырабатываются в организме вакцинируемого в процессе бактериальной пролиферации) в качестве векторов вакцинных антигенов не требует использования потенциально небезопасных адъювантов.

Пероральное введение пробиотической вакцины может помочь в проведении иммунизации среди групп населения, которым вакцинация противопоказана, а также, если это необходимо, практиковать частые и повторные иммунизации, такие как иммунизации против сезонных респираторных инфекций. В этом исследовании хорошо изученный пробиотический штамм *Enterococcus faecium* L3 (L3), который обладает рядом уникальных биологических свойств [12], использовали в качестве бактерии-реципиента. Штамм *E. faecium* L3 обладает выраженной антагонистической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, способностью восстанавливать кишечную микробиоту на фоне дисбактериозных состояний [13], а также оказывать иммуномодулирующее действие на организм хозяина [14].

E. faecium L3 синтезирует множество бактериоцинов, обладающих ингибирующей активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенов, которые обладают не только антибактериальным действием, но и проявляют противовирусные свойства *in vitro*. В штамме *E. faecium* L3, как и у других грамположительных бактерий, были обнаружены пили, которые представляют собой фимбрии длиной 0,3–3 мкм и диаметром 2–10 нм [15]. Эти нити на поверхности бактерий являются субъединицами белка пилина, связанными с помощью ковалентной связи. Они играют важную роль в адгезии и колонизации хозяина. Пили — это высокоиммуногенные структуры, находящиеся под избирательным давлением иммунных реакций хозяина [16]. Благодаря экспозиции целевого антигена на поверхности энтерококка, принцип модификации пилей *E. faecium* L3 вакцинными антигенами является перспективным и привлекательным подходом для создания эффективных живых вакцин.

Белок S отвечает за прикрепление к клетке-хозяину после распознавания рецептора человеческого ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), который играет ключевую роль в провоцировании иммунного ответа во время прогрессирования заболевания и является мишенью для нейтрализующих антител хозяина [17]. Таким образом, белок S служит ключевой мишенью при разработке вакцин против COVID-19. Показано, что эволюция пандемических штаммов вируса происходила преимущественно за счет мутаций в области RBD [18], позволяющих вирусу избегать иммунного распознавания, сформировавшегося в результате вакцинации или из-за болезни.

В данном исследовании для получения вакцинного кандидата против новых вариантов COVID-19 в интегративную плазмиду, вставленную в хромосому *E. faecium* L3, была включена ДНК, кодирующая полную область RBD белка S, содержащая три мутации N501Y, K417N и E484K, как показано в результатах. Две из этих мутаций (E484K и N501Y) находятся в рецептор-связывающем мотиве (RBM) RBD.

Полученная аминокислотная последовательность соответствовала линии бета-коронавируса B.1.351 (SARS-CoV-2), которая вырабатывает антитела, способные связывать не только бета-, но и гамма- и омикронные линии коронавируса [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью исследования явилось создание нового вакцинного кандидата для иммунизации слизистых оболочек против SARS-Cov-2. Фрагмент ДНК SARS-Cov-2, кодирующий белок SarsS1, был ин-

тегрирован в пробиотический геном *Enterococcus faecium*. Полученный штамм L3-SARS будет использован для дальнейших доклинических исследований с целью оценки его способности вызывать специфический гуморальный иммунный ответ, Т-клеточный ответ и защиту от SARS-Cov-2.

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors stated no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования РФ. Соглашение № 075-15-2022-302 (20.04.2022). / The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Agreement No. 075-15-2022-302 (20.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Suvorov A, Gupalova T, Desheva Y, et al. Construction of the enterococcal strain expressing immunogenic fragment of SARS-Cov-2 virus. *Frontiers in pharmacology*. 2022; 12:807256.
2. Barajas-Nava L. Development of SARS-CoV-2 vaccines. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2021;78(1):66–74.
3. Yuan M, Huang D, Lee C, et al. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. *Science*. 2021; 373(6556):818–823.
4. Larson K, Ammirati E, Adler E, et al. Myocarditis after BNT162b2 and mRNA-1273 vaccination. *Circulation*. 2021; 144(6):506–508.
5. Lui D, Lee K, Lee C, et al. Development of Graves' disease after SARS-CoV-2 mRNA vaccination: a case report and literature review. *Frontiers in public health*. 2021; 9:778964.
6. Cines D, Bussell J. SARS-CoV-2 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *The New England journal of medicine*. 2021;384:2254–2256.
7. Garg R, Paliwal V. Spectrum of neurological complications following COVID-19 vaccination. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2022; 43(1):3–40.
8. Moghimi SM. Allergic reactions and anaphylaxis to LNP-based COVID-19 vaccines. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2021; 29:898–900.
9. Gambichler T, Scholl L, Dickel H, et al. Prompt onset of Rowell's syndrome following the first BNT162b2

SARS-CoV-2 vaccination. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. 2021; 35:e415–e416.

10. Negahdaripour M, Shafiekhani M, Moezzi S, et al. Administration of COVID-19 vaccines in immunocompromised patients. *International immunopharmacology*. 2021; 99:108021.

11. Taghinezhad S, Mohseni A, Bermúdez-Humarán L, et al. Probiotic-based vaccines may provide effective protection against COVID-19 acute respiratory disease. *Vaccines*. 2021; 9(5):466.

12. Alekhina GG, Suvorov AN. Enterococcus strain Enterococcus faecium L-3 for preparing curative-prophylactic agents and foodstuffs of curative-prophylactic designation. Patent # RU 2220199 C1, 27.12.2003. In Russian [Алехина Г.Г., Суворов А.Н. Штамм энтерококков Enterococcus faecium L-3 для изготовления лечебно-профилактических средств и продуктов питания лечебно-профилактического назначения. Патент № RU 2220199 C1 от 27.12.2003.]

13. Yermolenko E, Chernish A, Aleshina G, et al. Antagonistic activity of Enterococcus faecium L3 against different groups of pathogenic streptococci. *International congress series*. 2006; 1289: 363–366.

14. Tarasova E, Yermolenko E, Donets V, et al. The influence of probiotic Enterococcus faecium strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. *Beneficial microbes*. 2010; 1(3):265–70.

15. Telford J, Barocchi M, Margarit I, et al. Pili in gram-positive pathogens. *Nature reviews. Microbiology*. 2006; 4(7):509–19.

16. Danne C, Dramsi S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. *Research in microbiology*. 2012; 163(9–10):645–58.

17. Tai W, He L, Zhang X, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: Implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & molecular immunology*. 2020, 17, 613–620.

18. Mittal A, Khattri A, Verma V. Structural and antigenic variations in the spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. *PLOS Pathogens*. 2022; 18(2): e1010260.

19. Reincke SM, Yuan M, Kornau HC, et al. SARS-CoV-2 Beta variant infection elicits potent lineage-specific and cross-reactive antibodies. *Science*. 2022; 375(6582):782–787.

Информация об авторах:

Бормотова Елена Алексеевна, научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Гупалова Татьяна Виталиевна, д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Суворов Александр Николаевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ».

Author information:

Bormotova Elena A., research associate at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Gupalova Tatiana V., leading researcher at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Suvorov Alexander N., PhD, Dr. Med. Sci., professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Microbial therapy Department of Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine.