

*A.V. Kolesnikov^{1,2}, A.V. Kozyr¹, I.G. Shemyakin¹, L.A. Lisitskaya¹,
M.A. Mar'yan¹, A.K. Ryabko¹, I.A. Dyatlov¹*

СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская область;

²Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская область

На протяжении многих десятилетий, живые вакцины остаются наиболее эффективным средством профилактики бактериальных инфекций. Основным источником вакцинных штаммов до последнего времени являлись эмпирически отобранные бактерии, вирулентность которых была аттенуирована в силу природных мутаций. Несмотря на эффективность таких вакцин в отношении ряда инфекций, для многих патогенов использование аттенуированных штаммов либо не обеспечивает достаточной защиты, либо является небезопасным. Традиционные технологии создания вакцин зачастую малоэффективны при отсутствии у патогена выраженных «протективных» антигенов. В последние годы развитие получили методы рационального конструирования живых вакцин на основе методологий синтетической биологии. Вклад синтетической биологии в создание вакцин не ограничивается использованием средств биоинформатики и конструированием оптимизированных фрагментов ДНК, а включает в себя скоординированные изменения различных компонентов бактериального генома, создание векторных штаммов, включение в них видоизмененных иммуногенов и активаторов иммунной системы, поиск и дизайн иммуногенов *in silico* и многое другое. Методологии синтетической биологии позволяют объединить различные инженерные идеи и строительные блоки, полученные при создании и модификации различных профилактических, терапевтических и биоинженерных систем для получения микроорганизмов с качественно новыми и программируемыми свойствами, а в перспективе — в короткие сроки создавать вакцины «по требованию».

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 105—115

Ключевые слова: вакцины, синтетическая биология, бактериальные инфекции

*A.V. Kolesnikov^{1,2}, A.V. Kozyr¹, I.G. Shemyakin¹, L.A. Lisitskaya¹,
M.A. Mar'yan¹, A.K. Ryabko¹, I.A. Dyatlov¹*

SYNTHETIC BIOLOGY AS AN INSTRUMENT FOR DEVELOPMENT OF INNOVATIVE VACCINES FOR PROPHYLAXIS OF BACTERIAL INFECTIONS

¹State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region;

²Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow Region, Russia

For many decades, live vaccines remain the most effective means for prophylaxis of bacterial infections. Until recently, the main source of vaccine strains were empirically selected bacteria, virulence of which was attenuated due to natural mutations. Despite effectiveness of such vaccines against a number of infections, use of attenuated strains for many pathogens either does not induce sufficient protection, or is unsafe. Traditional technologies of vaccine creation frequently have low effectiveness with the lack of pronounced «protective» antigens in the pathogen. Methods of rational construction of live vaccines have received development in the recent years, based on methodology of synthetic biology. Contribution of synthetic biology into creation of vaccines is not limited to use of means of bioinformatics and construction of optimized DNA fragments, but also includes coordinated adjustments to various components of the bacterial genome, creation of vector strains, inclusion of altered immunogens and immune system activators into them, search and design of immunogens *in silico* and much more. Methodologies of synthetic biology allow to combine various engineering ideas and building blocks, obtained during creation and modification of various prophylaxis, therapeutic and bioengineering systems for production of microorganisms

with qualitatively novel and programmable properties, and in perspective — rapidly create vaccines «on demand».

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 105—115

Key words: vaccines, synthetic biology, bacterial infections

Несмотря на то, что термин «синтетическая биология» широко используется уже более 10 лет, а предложен был еще ранее, в настоящее время все еще сложно определить точные границы этого направления. Наглядным примером этому является опрос, проведенный журналом *Nature Biotechnology*, в рамках которого ведущие специалисты в области синтетической биологии давали весьма различные определения и характеристики этой области исследований [13].

Еще в 1978 году отмечалось, что «исследования в области эндонуклеаз рестрикции не только позволят нам с легкостью конструировать рекомбинантные молекулы ДНК и анализировать индивидуальные гены, но также приведут нас в новую эру, эпоху «синтетической биологии», где будут не только изучаться существующие гены, но создаваться и оцениваться новые генетические конструкторы» [42]. Механистически синтетическую биологию действительно можно рассматривать как продолжение генетической инженерии с той разницей, что гены конструируются *in silico*, а затем синтезируются и собираются в конструкторы более высокого порядка [14]. На самом деле, концепция синтетической биологии включает в себя и химические, и компьютерные методологии, объединяемые подходами «общей» традиционной инженерии [6]. Инженерные дисциплины подразумевают использование хорошо охарактеризованных и рационально сконструированных узлов и блоков для создания систем с заранее заданными и хорошо предсказуемыми характеристиками и возможность представить конструируемую систему в виде таких узлов, блоков, объединенных как горизонтально, так и иерархически [15]. В синтетической биологии появлению таких блоков и систем предшествовали многолетние молекулярно-биологические, биохимические и генноинженерные исследования. Возникла возможность не только точечного изменения организмов в результате мутаций, но и объединения различных модификаций, а также добавленных извне блоков (в том числе, и из гетерологичных биологических систем) в скоординировано работающие молекулярные машины, выполняющие какую-либо новую функцию или придающие модифицированному организму (или даже неживой, или квазиживой биологической системе) новое сложное качество [27, 40].

Таким образом, к синтетической биологии можно, в первую очередь, отнести скоординированное и масштабное изменение генома с целью формирования новой функции в рамках биологической системы. При этом, если в течение ряда предшествующих лет работы в области синтетической биологии носили, в основном, экспериментальный исследовательский характер, то в последние годы наметилось развитие реальных практических приложений синтетической биологии, в том числе и в области медицины [47]. Уместно отметить, что с накоплением знаний в области биотехнологии и синтетической биологии развитие получают не только модифицированные живые системы, но и конструкторы *in vitro*, не содержащие генетического материала, но способные

длительно поддерживать различные функционально сложные процессы, в частности направленные на решение биомедицинских задач [21].

В микробиологии в качестве основных направлений синтетической биологии можно рассматривать биотехнологическое и медицинское, важнейшей задачей которого, очевидно, является борьба с инфекциями. И хотя роль синтетической биологии в решении задач данного направления может быть весьма многоплановой, одной из первоочередных ее задач в приложении к борьбе с бактериальными инфекциями является создание вакцин нового поколения.

Вакцинация является наиболее эффективным средством борьбы с инфекционными заболеваниями. В эпоху, предшествовавшую масштабному развитию биотехнологии, вакцинация позволила свести к минимуму заболеваемость дифтерией, коклюшем, столбняком. Развитие биотехнологии, иммунологии и понимание механизмов защиты от инфекции привели к созданию синтетических и субъединичных вакцин, в частности вакцин для профилактики менингококковой, пневмококковой, брюшнотифозной и Нив-инфекций. Однако, несмотря на указанные достижения, существует значительное число бактериальных патогенов, для которых до сих пор не удалось разработать эффективную и безопасную вакцину, пригодную для массового применения. Для ряда патогенов эффективность убитых или субъединичных вакцин оказывается недостаточной, а экспериментальные живые вакцины, основанные на эмпирических данных о протективных свойствах аттенуированных штаммов патогена, зачастую непригодны для массового применения ввиду высокой реактогенности и остаточной вирулентности микроорганизмов. С другой стороны, многолетний опыт создания антибактериальных вакцин свидетельствует о том, что, как правило, живые вакцины превосходят как убитые бактерии, так и рекомбинантные и очищенные антигены и антигенные композиции по эффективности и длительности протективного иммунного ответа. Синтетическая биология предлагает разнообразные инструменты для создания высокоэффективных и безопасных живых вакцин нового поколения [23].

Связь между уровнем вирулентности аттенуированного вакцинного штамма и степенью протективного эффекта, достигаемого при иммунизации, была подробно исследована на примере экспериментальных живых вакцин для профилактики сальмонеллезной инфекции [46]. Эти работы с методологической точки зрения можно рассматривать как фундамент для создания любых живых вакцин и, в то же время, как исследования в области синтетической биологии. Исследования, проводившиеся на протяжении ряда лет, выявили гены, мутации в которых скоординированно снижают вирулентность сальмонелл. Статистический анализ показал значительную корреляцию иммуногенности и вирулентности возбудителя. Из этого следовало, что живая вакцина, обладающая заведомо низкой вирулентностью, скорее всего, окажется недостаточно иммуногенной, в то время как высоковирулентный иммуногенный штамм невозможно применять из соображений безопасности [18]. Достижение такого баланса между иммуногенностью и вирулентностью, который позволит сконструировать вакцинный штамм с оптимальными протективными характеристиками, несомненно, относится к области синтетической биологии [46]. Такой эффект может быть достигнут по-разному: в редких случаях — за счет блокировки части важнейших факторов вирулентности, как в случае

инактивации холерного токсина и делеции гена гемолизина для конструирования живой холерной вакцины [43], но чаще только за счет более тонкой скоординированной инактивации различных генов, обеспечивающих жизнеспособность патогена в условиях нахождения в организме-хозяине [30]. Атенуированные штаммы других видов патогенов создавались с использованием аналогичных интеративных технологий [18].

К сожалению, прямые методы конверсии патогена в вакцинный штамм, подобные описанным выше, не всегда оказываются успешными. Накопленные в последние годы данные частично проливают свет на причины неудач в использовании инактивации эмпирически определенных генов для создания эффективных живых вакцин. Очень часто спектр белков, экспрессируемых при взаимодействии патогена с клетками организма-хозяина, значительно отличается от продуктов экспрессии того же микроорганизма при росте на питательных средах [9, 26]. Поскольку механизм действия тех или иных белков зачастую неизвестен, также как и паттерн их экспрессии, предсказать влияние полной инактивации того или иного гена на иммуногенность и протективные свойства модифицированного штамма очень трудно. Недавно было показано, что в зависимости от набора аттенуирующих мутаций, в геноме *Salmonella typhimurium* происходят не только количественные, но и качественные изменения в наборе секретируемых цитокинов и, соответственно, в модуляции иммунного ответа. С другой стороны, различные рецепторы врожденного иммунитета организма-хозяина могут играть противоположную роль в развитии иммунного ответа к патогену, вызывая повышение или понижение эффективности иммунного ответа к сальмонеллам [31]. Таким образом, сальмонеллы, не имеющие ярко выраженного механизма вирулентности и подавления иммунитета хозяина, основанного на одном или немногих факторах, и использующие сложную систему регуляторов для выживания в макрофагах, являются примером необходимости использования методов синтетической биологии для создания по-настоящему эффективных вакцин.

Из приведенной выше информации следует, что полная инактивация того или иного фактора вирулентности может существенно отразиться на иммуногенности вакцинного штамма. К очевидной потере иммуногенности, например, может привести нарушение сигнальной цепочки, в результате которой на поверхности клетки блокируется синтез адгезина или инвазина, или иного белка, необходимого для колонизации бактерией иммунокомпетентных органов, что, с одной стороны, является инструментом патогена по ослаблению иммунного ответа, но с другой — единственным способом этот ответ индуцировать. В ряде случаев отключение важнейшего фактора вирулентности может активировать различные компенсаторные механизмы, в результате чего патогенность мутантной бактерии может в значительной степени сохраниться [8]. Поэтому в последние годы усилия исследователей были сконцентрированы на том, чтобы создать патоген, который бы продуцировал все или практически все факторы вирулентности, но имел строго ограниченный и модулируемый срок существования в организме хозяина. И действительно, эти соображения привели к созданию вакцинного штамма сальмонеллы, который сохраняет практически все свойства полностью вирулентного штамма дикого типа, но имеет ограниченный срок жизни в организме-хозяине. Это достигается за счет постановки ряда жизненно важных генов и факторов вирулентности патогена под контроль арабинозного промотора (*araBAD*) [18, 30]. При культивирова-

нии *in vitro* в присутствии арабинозы рост штамма происходит без ограничений. При попадании в организм по мере истощения эндогенной арабинозы, захваченной из ростовой среды, размножение бактерий замедляется, а в течение 3 суток и вовсе останавливается. Срок размножения вакцинного штамма можно увеличить путем приема арабинозы. За время размножения в вакцинируемом организме бактерии успевают проникнуть в иммунокомпетентные органы и ткани, вызвать иммунный ответ, сравнимый с ответом на полностью вирулентные штаммы, однако далее патологический процесс не развивается, поскольку рост патогена блокируется в отсутствие арабинозы, нормальная концентрация которой в организме человека и животных слишком низкая для поддержания активности арабинозного промотора [18].

Использование гетерологичных промоторов для ограничения продукции группы генов, регулируемого во времени, является весьма удачным решением, однако не стоит забывать, что эти промоторы контролируют полноценные факторы вирулентности, рекомбинация которых или горизонтальный перенос в другие микроорганизмы могут оказаться нежелательным и крайне опасным явлением. Кроме того, активность арабинозного промотора сама по себе не является дозозависимой, и промоторы в разных клетках — членах одной и той же популяции на самом деле отключаются при различной концентрации индуктора, делая невозможной тонкую настройку уровня экспрессии факторов вирулентности и сужая возможности управления эффективностью иммунного ответа [28].

Системы тонкой регуляции экспрессии факторов вирулентности могут быть созданы при воздействии на эффективность трансляции белка. Известно, что наиболее продуктивные системы эукариотической экспрессии были получены на основе селекции конструкторов, содержащих гены селективных маркеров, которые высокоэффективно транскрибируются при низком уровне трансляции продукта, вызванной мутациями, использованием поврежденных систем инициации трансляции и другими способами. Высокий уровень транскрипции оперона, в котором содержится низкоэффективно продуцирующийся или низкоактивный селективный маркер, обуславливает суперпродукцию «пассажирского» белка (например, терапевтического антитела), транслируемого с той же РНК, но с использованием корректной инициации трансляции [45]. Для микроорганизмов наиболее очевидным способом контроля уровня трансляции является использование субоптимальных кодонов, для которых количество продуцируемой в данном микроорганизме тРНК низкое [24]. Относительно недавно методами биоинформатики был обнаружен и подтвержден на практике феномен парных кодонов, в рамках которого комбинации двух последовательных кодонов определенных аминокислот не случайны. Иными словами, в рамках вырожденности генетического кода для ряда последовательно расположенных пар аминокислот вероятность кодирования одним из типов кодонов намного выше, чем другим. Экспериментально было показано, что постановка в этих положениях непарных кодонов для тех же аминокислот существенно снижала уровень трансляции [20]. Этот метод был использован для конструирования аттенуированных вакцинных штаммов энтеротоксигенной *Escherichia coli* [36] и пневмококков [8]. В случае пневмококков использование постепенного снижения уровня экспрессии основного фактора вирулентности — пневмолизина позволило получить экспериментальное подтверждение гипотезе о некорректной «температуре» иммунного

ответа как одним из факторов борьбы патогена с иммунной системой хозяина. При чрезмерной «температуре», вызванной большой концентрацией активирующих антигенов, происходит массивный выброс цитокинов (цитокиновый шторм), для блокировки которого организм вынужден запускать механизмы сглаживания чрезмерной активации иммунной системы [11]. Это позволяет патогену избежать эффективного распознавания иммунной системой. Кроме того, целый ряд токсинов и факторов вирулентности действует непосредственно на иммунокомпетентные клетки, подавляя активацию корректного иммунного ответа. При низкой «температуре» ответа патоген либо уходит от распознавания иммунной системой и формирует персистирующую инфекцию [22], либо слишком быстро теряет жизнеспособность и, вследствие этого, недостаточно эффективно стимулирует иммунный ответ.

Таким образом, использование синтетико-биологического подхода позволило не только создать новый тип вакцинного штамма *Streptococcus pneumoniae*, но и экспериментально подтвердить иммунологическую концепцию о необходимости сбалансированной «температуры» иммунного ответа для достижения оптимального протективного эффекта [18, 36]. Возможности модификаций генетического кода в пределах одного белка среднестатистического размера (300 — 700 аминокислотных остатков) настолько велики, что можно добиться не только весьма тонкой настройки уровня экспрессии антигена в составе вакцинного штамма, но и заведомо предотвратить реверсию мутанта к дикому типу, которая весьма возможна при рекомбинации гена дикого типа, контролируемого регулируемым гетерологичным промотором, или при инактивации гена за счет точечной мутации. Развитие компьютерных методов оптимизации и деоптимизации кодирующих последовательностей обеспечит высокоточное программирование уровня продукции целевых антигенов [19].

Для иммунизации против инфекции, вызванной рядом сероваров *S. pneumoniae*, достаточно успешно используется конъюгированная вакцина на основе капсульного полисахарида патогена. Однако ввиду значительного (около 92) числа известных серотипов создание универсальной вакцины является затруднительным. Более того, опыт применения мультивалентной конъюгированной вакцины показал, что элиминация серотипов, против которых была направлена данная вакцина, привела к распространению других серотипов патогена, часть из которых оказалась способна вызывать агрессивное заболевание [7].

Распространение альтернативных серотипов, а также существование сероваров различных патогенов, для которых создание субъединичной или конъюгированной вакцины затруднительно, не является исключительным феноменом. Для создания вакцин против таких атипичных вариантов патогена активно разрабатывается подход, известный как обратная вакцинология, который заключается в комплексном биоинформационно-функциональном анализе бактериальных антигенов и идентификации кандидатных иммуногенов. Обратная вакцинология, без сомнения, может рассматриваться как часть синтетической биологии в приложении к созданию вакцин [2, 34]. Доступность баз данных гомологичных белковых последовательностей из различных бактериальных геномов, а также различные признаки, указывающие на принадлежность того или иного гена или генетического кластера к факторам вирулентности и/или островкам патогенности (например, преимущественное

использование кодонов иных, чем основной геном, и сосуществование с гомологами известных факторов вирулентности), позволяют целенаправленно отбирать антигены-кандидаты. Основанием для отбора также является наличие сигнальных пептидов (у секретируемых белков) и трансмембранных доменов (у потенциальных поверхностных антигенов), определяемое *in silico* с помощью отработанных компьютерных алгоритмов [25]. Отобранные антигены продуцируют в *E. coli* и изучают индуцируемый ими иммунный ответ [37]. Отобранные на основании изучения индукции иммунного ответа антигены анализируют *in vivo* на наличие протективной активности. Одним из важных выводов из систематического анализа антигенов на основе обратной вакцинологии является то, что наибольший протективный эффект не обязательно присущ наиболее иммунодоминантным антигенам [3].

Первым примером успешного применения обратной вакцинологии является создание вакцины для профилактики менингококковой инфекции, вызываемой сероваром группы В (*MenB*). Создание конъюгированной вакцины в случае *MenB* невозможно, поскольку капсульный полисахарид этого серовара имеет значительное структурное сходство с олигосахаридами человека [17]. Стандартные эмпирические подходы к созданию *MenB*-вакцины оказались неэффективны ввиду высокой вариабельности поверхностных антигенов патогена [1]. Анализ иммуногенности и протективного эффекта был проведен для 350 из 570 кандидатных белков *Neisseria meningitidis*, отобранных на основе описанных выше критериев [12]. На момент анализа 220 белков не удалось проэкспрессировать в *E. coli*, в основном ввиду неоптимального для кишечной палочки использования кодонов. В настоящее время благодаря достижениям в области кодонной оптимизации, большинство этих белков можно было бы эффективно продуцировать в гетерологичных системах экспрессии. Тем не менее, 5 отобранных на основании бактерицидного эффекта при иммунизации антигенов позволили успешно завершить клинические испытания и создать вакцину, эффективную для профилактики инфекции *MenB* [33].

Успех методологии обратной вакцинологии способствовал развитию работ по идентификации протективных антигенов для целого ряда патогенов, включая *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *S. pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia pneumoniae* и *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Накопление информации о структуре геномов и функции белков, образующих межвидовые гомологичные кластеры (COGs), а также о структуре иммунодоминантных эпитопов этих белков позволит в дальнейшем создавать вакцины, обеспечивающие защиту от все более широкого спектра вариантов одного и того же вида патогена [34].

В настоящее время, продуктами обратной вакцинологии являются субъединичные вакцины. Однако в рамках синтетической биологии нетрудно представить себе, что гены для идентифицированных различными путями протективных антигенов можно встроить в обладающий хорошо известными (и модифицированными) характеристиками вакцинный штамм бактерий другого вида. Этот подход активно развивается в последние годы, а прототипы вакцин, полученные таким путем называются векторными. В качестве бактериальных векторов используются хорошо охарактеризованные аттенуированные штаммы патогенов, такие как *Salmonella*, *Listeria* [38], которые фактически сами являются продуктом синтетической биологии. Использование живых векторных вакцин имеет значительные преимущества по сравнению с субъ-

единичными вакцинами. В частности, аттенуированные патогены не только могут пересекать различные барьеры в организме, такие как слизистые оболочки, защищая переносимые антигены от преждевременной деградациии, но и доставлять их в иммунокомпетентные клетки и ткани. Например, сальмонеллы имеют тропизм к М-клеткам пейеровых бляшек, которые окружают лимфоидные ткани кишечника, имеющие принципиальное значение для активации иммунного ответа [39]. Поглощение сальмонелл фагоцитами приводит к переносу микроорганизмов в лимфоидные органы и стимуляции иммунного ответа. Системы секреции сальмонелл способны выводить антигены в экстраклеточное пространство организма-хозяина, где они захватываются антигенпрезентирующими клетками, стимулируя Т-клеточный иммунный ответ [16]. Такие секреторные системы можно настроить и на продукцию цитокинов, которые работают как дополнительные высоко эффективные индукторы желаемого типа иммунного ответа. Первоначально бактериипродуценты цитокинов создавались для разработки противоопухолевых векторных вакцин [4]. Универсальные принципы иммунного ответа позволяют использовать такие продуценты и для создания экспериментальных антибактериальных векторных вакцин как на основе различных аттенуированных патогенных микроорганизмов [5], так и на основе непатогенных бактерий [44]. Микроорганизмы-векторы на основе симбиотических микроорганизмов, таких как лактококки, эффективно доставляют антигены на слизистые оболочки организма-хозяина, способствуя развитию иммунного ответа [48]. Вместе с тем, симбионты не имеют ряда механизмов индукции иммунного ответа, присущих патогенным аттенуированным векторам. Однако в случае необходимости иммунизации пациентов с иммунодефицитными состояниями аттенуированные патогенные микроорганизмы могут оказаться недостаточно безопасными. Пониженный уровень активации иммунной системы симбионтами может быть частично скомпенсирован параллельной продукцией цитокинов и других активирующих факторов [49].

Подобно цитокинам, вакцинные штаммы микроорганизмов могут нести и другие гены, продукция которых меняет характер взаимодействия бактерий с иммунной системой, повышая эффективность иммунного ответа. Известно, что липополисахариды (ЛПС) клеточной стенки многих микроорганизмов являются эндотоксинами, которые вызывают стрессовую реакцию организма, используемую патогенами для блокировки продуктивного иммунного ответа [29]. Изучение структуры ЛПС ряда грамотрицательных бактерий показало, что удаление некоторых компонентов эндотоксина, в первую очередь, дефосфорилирование, значительно снижает реактивность организма к модифицированному пирогену. Более того, дефосфорилированный низкопирогенный ЛПС, в частности, монофосфорил липид А (MPLA) является эффективным иммуногеном. Введение в ряд бактериальных штаммов ферментов, дефосфорилирующих ЛПС, служит для эффективного повышения иммуногенности [35]. Повышения эффективности иммунного ответа добивались также, вводя в вакцинные штаммы гены, продуктами которых являются различные молекулярные адьюванты — лиганды рецепторов врожденного иммунитета как белковой, так и не белковой природы [41].

Векторные вакцины являются наглядной иллюстрацией сути синтетикобиологического подхода: принципы и технологии, разработанные для одного вида бактерий, для одного из направлений вакцинации (например, вакцины

против внутриклеточных патогенов, которые должны индуцировать развитый Т-клеточный иммунный ответ), а также сами модифицированные в рамках синтетической биологии микроорганизмы могут с успехом использоваться для создания вакцин, защищающих от совершенно иных патогенов, и борьбы с заболеваниями другого типа, в частности, с опухолями [23]. Сложные комбинации модификаций на геномном, протеомном и метаболическом уровне формируют среду, необходимую для достижения максимально эффективной защиты организма от инфекции. Таким образом, реализуется модульная архитектура синтетической биологии, которая обещает в ближайшем будущем создание вакцин «по требованию», что весьма важно в условиях быстро меняющегося ландшафта инфекционных заболеваний, риска биотерроризма и появления атипичных патогенов [10].

Методы синтетической биологии являются неисчерпаемым источником для конструирования вакцин нового поколения, в которых разработки, созданные в одних условиях и для одного вида или группы видов патогенов, могут быть эффективно использованы напрямую как строительные блоки или опосредованно как инженерные подходы и концепции. Развитие новых технологий, в первую очередь, биоинформационных, методов высокопроизводительного секвенирования и методов синтеза генов и оптимизации различных характеристик их продуктов, включая иммунологические и метаболомные, позволит перейти к практическому конструированию микроорганизмов с широким спектром заданных иммунологических свойств [32]. Построенные на этой основе модели минимальных геномов и их реализация обеспечат высокую эффективность и безопасность синтетических живых вакцин, которые могут появиться в ближайшем будущем [10, 50].

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения о субсидии от 27 июня 2014 года №14.604.21.0067 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0067).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bai X., Borrow R. Genetic shifts of *Neisseria meningitidis* serogroup B antigens and the quest for a broadly cross-protective vaccine. *Expert. Rev. Vaccines*. 2010, 9(10): 1203-1217.
2. Bambini S., Rappuoli R. The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug Discov. Today*. 2009, 14: 252-260.
3. Barat S., Willer Y., Rizos K. et al. Immunity to intracellular *Salmonella* depends on surface-associated antigens. *PLoS Pathog.* 2012, 8(10):e1002966. doi:10.1371/journal.ppat.1002966.
4. Bolhassani A., Zahedifard F. Therapeutic live vaccines as a potential anticancer strategy. *Int. J. Cancer*. 2012, 131 (8): 1733-1743.
5. Carleton H.A. Pathogenic bacteria as vaccine vectors: teaching old bugs new tricks. *Yale J. Biol. Med.* 2010, 83 (4): 217-222.
6. Cheng A.A., Lu T.K. Synthetic biology: an emerging engineering discipline. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2012, 14: 155-178.
7. Cremers A.J., Mobegi F.M., de Jonge M.I. et al. The post-vaccine microevolution of invasive *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* 2015, 5: 14952.
8. Coleman J.R., Papamichail D., Yano M. et al. Designed reduction of *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity via synthetic changes in virulence factor codon-pair bias. *J. Infect. Dis.* 2011, 203 (9): 1264-1273.
9. Dastgheyb S.S., Otto M. Staphylococcal adaptation to diverse physiologic niches: an overview of transcriptomic and phenotypic changes in different biological environments. *Future Microbiol.* 2015, 10: 1981-1995.
10. De Groot A.S., Einck L., Moise L. et al. Making vaccines «on demand»: a potential solution for emerging pathogens and biodefense? *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013, 9 (9): 1877-1884.

11. D'Elia R.V., Harrison K., Oyston P. C. et al. Targeting the «cytokine storm» for therapeutic benefit. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, 20 (3): 319-327.
12. Del Tordello E., Serruto D. Functional genomics studies of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Brief Funct. Genomics.* 2013, 12 (4): 328-340.
13. Editorial. *Synthetic Biology: What's in a name?* *Nature Biotechnology.* 2009, 27 (12): 1071-1073.
14. Editorial. *Unbottling the genes.* *Nature Biotechnology.* 2009, 27 (12): 1059.
15. Endy D. Foundations for engineering biology. *Nature.* 2005, 438 (7067): 449-453.
16. Figueira R., Watson K.G., Holden D.W. et al. Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar typhimurium: implications for rational vaccine design. *MBio.* 2013, 4 (2): e00065.
17. Finne J., Bitter-Suermann D., Goridis C. et al. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J. Immunol.* 1987, 138: 4402-4407.
18. Galen J.E., Curtiss R. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine.* 2014, 32 (35): 4376-4385.
19. Gould N., Hendy O., Papamichail D. Computational tools and algorithms for designing customized synthetic genes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2014, 2: 41.
20. Gutman G.A., Hatfield G.W. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989, 86, (10): 3699-3703.
21. Hörner M., Reischmann N., Weber W. Synthetic biology: programming cells for biomedical applications. *Perspect. Biol. Med.* 2012, 55 (4): 490-502.
22. Jefferies J.M. C., Johnston C.H. G., Kirkham L-A.S. et al. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J. Infect. Dis.* 2007, 196 (6): 936-944.
23. Kindsmüller K., Wagner R. Synthetic biology: impact on the design of innovative vaccines. *Hum. Vaccin.* 2011, 7 (6): 658-662.
24. Kleber-Janke T., Becker W. M. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr. Purif.* 2000, 19 (3): 419-424.
25. Liljeroos L., Malito E., Ferlenghi I. et al. Structural and computational biology in the design of immunogenic vaccine antigens. *J. Immunol. Res.* 2015, 4: 1-17.
26. Liss V., Hensel M. Take the tube: remodelling of the endosomal system by intracellular *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol.* 2015, 17 (5): 639-647.
27. Liu Y., Shin H.D., Li J. et al. Toward metabolic engineering in the context of system biology and synthetic biology: advances and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99 (3): 1109-1118.
28. Morgan-Kiss R.M., Wadler C., Cronan J. E. et al. Long-term and homogeneous regulation of the *Escherichia coli* araBAD promoter by use of a lactose transporter of relaxed specificity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002, 99 (11): 7373-7377.
29. Neyen C., Lemaitre B. Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. *Curr. Opin. Immunol.* 2015, 38: 8-17.
30. Pascual D.W., Suo Z., Cao L. et al. Attenuating gene expression (AGE) for vaccine development. *Virulence.* 2013, 4 (5): 384-390.
31. Powell D.A., Roberts L.M., Ledvina H.E. et al. Distinct innate responses are induced by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants. *Cell Immunol.* 2016, 299: 42-49.
32. Reiss T. *Synthetic Biology.* *FEBS Lett.* 2012, 586 (15): 2027-2028.
33. Rollier C.S., Dold C., Marsay L. et al. The capsular group B meningococcal vaccine, 4CMenB: clinical experience and potential efficacy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2015, 15 (1): 131-142.
34. Rinaudo C.D., Telford J.L., Rappuoli R. et al. Vaccinology in the genome era. *J. Clin. Invest.* 2009, 119 (9): 2515-2525.
35. Ruchaud-Sparagano M.H., Mills R., Scott J. et al. MPLA inhibits release of cytotoxic mediators from human neutrophils while preserving efficient bacterial killing. *Immunol. Cell Biol.* 2014, 92 (9): 799-809.
36. Runco L.M., Stauf C.B., Coleman J.R. Tailoring the immune response via customization of pathogen gene expression. *J. Pathog.* 2014: 1-7.
37. Serruto D., Bottomley M.J., Ram S. et al. The new multicomponent vaccine against menin-

- gococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*. 2012, 30 (2): 87-97.
38. Shahabi V., Maciag P.C., Rivera S. et al. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng. Bugs*. 2010, 1 (4): 235-243.
 39. Shima H., Watanabe T., Fukuda S. et al. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. *Int. Immunol.* 2014, 26 (11): 619-625.
 40. Slusarczyk A.L., Lin A., Weiss R. Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13 (6): 406-420.
 41. Steinhagen F., Kinjo T., Bode C. et al. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*. 2011, 29 (17): 3341-3355.
 42. Szybalski W., Skalka A. Nobel prizes and restriction enzymes. *Gene*. 1978, 4: 181-182.
 43. Tacket C.O., Losonsky G., Nataro J.P. et al. Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110, a delta ctxA delta zot delta ace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholera*. *J. Infect. Dis.* 1993, 168 (6): 1536-1540.
 44. Tarahomjoo S. Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Mol. Biotechnol.* 2012, 51 (2): 183-199.
 45. Van Blokland H.J., Kwaks T.H., Sewalt R.G. et al. A novel, high stringency selection system allows screening of few clones for high protein expression. *J. Biotechnol.* 2007, 128 (2): 237-245.
 46. Wang S., Kong Q., Curtiss R. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb. Pathog.* 2013, 58: 17-28.
 47. Weber W., Fussenegger M. Emerging biomedical applications of synthetic biology. *Nat. Rev. Genet.* 2011, 13 (1): 21-35.
 48. Wyszynska A., Kobiernicka P., Bardowski J. et al. Lactic acid bacteria — 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99 (7): 2967-2977.
 49. Zhang H.X., Qiu Y.Y., Zhao Y.H. et al. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Mol. Cell. Probes*. 2014, 28 (1): 25-30.
 50. Zhang L.Y., Chang S.H., Wang J. How to make a minimal genome for synthetic minimal cell. *Protein Cell*. 2010, 1 (5): 427-434.

Поступила 03.03.16

Контактная информация: Козырь Арина Владимировна, к.б.н.,
142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, р.т. (4967)36-00-60

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Л.А.Лисицкая¹, А.В.Колесников^{1,2}, А.В.Козырь¹,
И.Г.Шемякин¹, А.К.Рябко¹, О.Н.Красавцева¹, И.А.Дятлов¹

БЕЛКИ И ДРУГИЕ ВОЗМОЖНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОНЬЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН: СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

¹ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская область;
²Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская область

Вакцинация является ключевым элементом профилактики инфекционных заболеваний. Для ряда патогенных микроорганизмов были разработаны эффективные вакцины на основе полисахаридной капсулы. Эффективность полисахаридов как антигена однако низкая у основных групп риска — младенцев и пациентов с иммунодефицитными состояниями. Принципиальным шагом вперед стало использование в качестве вакцин полисахаридных антигенов, конъюгированных с белковыми носителями. Несмотря на то, что использование носителей стало прорывом в повышении эффективности вакцин, механизмы взаимодействия белкового и углеводного компонентов вакцины в индукции Т-клеточного иммунного ответа и иммунологической памяти до сих пор полностью не