

- 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

изучены. Отсутствие теоретической базы затрудняет проведение направленного инженеринга конъюгированных вакцин с целью расширения их номенклатуры и повышения эффективности. Несмотря на значительный объем новой информации в области взаимодействия различных антигенов и значительное расширение спектра потенциальных носителей, в том числе, и не белковой природы, число патогенов, для которых конъюгированные вакцины внедрены в клиническую практику, увеличилось незначительно. В обзоре суммирована информация о проблемах и перспективах использования носителей для конъюгированных полисахаридных вакцин.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 115—124

Ключевые слова: белок-носитель, конъюгированная вакцина, CRM197, дифтерийный токсид, столбнячный токсид, белок D *Haemophilus influenzae*, комплекс белков наружной мембраны *Neisseria*

*L.A.Lisitskaya*¹, *A.V.Kolesnikov*^{1,2}, *A.V.Kozyr*¹,
*I.G.Shemyakin*¹, *A.K.Ryabko*¹, *O.N.Krasavtseva*¹, *I.A.Dyatlov*¹

PROTEINS AND OTHER CARRIERS FOR CREATION OF CONJUGATED VACCINES: PROPERTIES AND APPLICATION

¹State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region;
²Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow Region, Russia

Vaccination is a key element in prophylaxis of infectious diseases. Effective vaccines based on polysaccharide capsules were developed for a number of microorganisms. Effectiveness of polysaccharides as antigens, however, is low in the main risk groups — infants and patients with immune-deficiency conditions. Use of polysaccharide antigens conjugated with protein carriers as vaccines became a principal step forward. Though use of carriers became a breakthrough for vaccine effectiveness increase, mechanisms of interaction of proteins and carbohydrate components of the vaccines in T-cell immune response induction and immunological memory remains studied incompletely. Lack of theoretical base complicates execution of directed engineering of conjugated vaccines with the goal of expansion of their nomenclature and effectiveness increase. Despite significant volume of new information in the field of interaction of various antigens, and significant expansion of spectrum of potential carriers, including of non-protein nature, the number of pathogens, for which conjugated vaccines are introduced into clinical practice, remains insignificant. Information regarding problems and perspectives of use of carriers for conjugated polysaccharide vaccines is summarized in the review.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 115—124

Key words: protein-carrier, conjugated vaccine, CRM197, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* protein D, *Neisseria* outer membrane protein complex

Многие патогенные бактерии, вызывающие инфекционные заболевания, имеют полисахаридную капсулу. Инкапсулированные бактерии *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus influenzae* вызывают тяжелые заболевания, такие как сепсис, пневмония и менингит. Наибольшую опасность эти патогены представляют для пожилых людей, детей и пациентов с иммунодефицитными состояниями. Капсулы блокируют продуктивный фагоцитоз бактерий за счет понижения эффективности фиксации комплемента и опсонизации патогена. С другой стороны, капсульные экзополисахариды бактерий (ЭПС) иммуногенны и много десятилетий используются как антигены для создания вакцин [26].

Капсульные полисахариды относятся к Т-независимым антигенам. Они не процессируются антигенпрезентирующими клетками, но взаимодействуют с В-клетками, индуцируя синтез антител. Т-независимый иммунный ответ, как

правило, не сопровождается переключением изотипов антител: отмеченные случаи переключения следует рассматривать, скорее, в качестве исключения, нежели, как правило [28]. Независимость иммунного ответа к ЭПС от Т-клеток постулирована на основании того, что при иммунизации такие антигены индуцируют, главным образом, IgM и в меньшей степени IgG2 без значительного переключения изотипов и при отсутствии индукции IgG1 и IgG3 [11]. В ответ на Т-независимые (Ti) антигены не формируется Т-клеточная иммунологическая память и не индуцируется вторичный иммунный ответ. В-клеточная память на Т-независимые полисахаридные антигены существенно отличается от памяти, формирующейся в ответ на белковые антигены. Уместно отметить, что экспериментально наличие иммунологической памяти к Ti антигенам, в частности, к ЭПС, было подтверждено сравнительно недавно [46]. Классические капсульные полисахариды бактерий в определенных условиях вызывают Т-клеточный ответ, однако его интенсивность можно рассматривать как низкую [22]. Особенности иммунного ответа делают полисахариды капсул бактерий практически не иммуногенными для детей в возрасте до 18 месяцев, инфекции у которых наблюдаются чаще и протекают тяжелее, чем у остальных возрастных групп. Эффективность защиты от инфекции при иммунизации полисахаридными вакцинами у старших возрастных групп также снижена [16, 46].

Способность усиливать иммуногенность полисахаридных антигенов (ПС) за счет химически конъюгированных с ними белковых антигенов впервые была обнаружена Эвери и Гобелем в 1929 г. Было показано, что слабая иммуногенность ЭПС типа 3 *S. pneumoniae* может быть усилена путем химической конъюгации полисахарида с белковыми носителями [7]. Дополнительным основанием для возможного повышения иммуногенности полисахаридов и других молекул при ковалентной конъюгации с белками стала теория гаптеннов [25]. Однако практическое использование обнаруженного феномена стало возможным почти 60 лет спустя, после формирования представлений о различных ветвях иммунного ответа, протективных антигенах бактерий, Т- и В-клеточном иммунитете. В результате этих фундаментальных открытий, в клиническую практику впервые были введены конъюгированные вакцины для профилактики инфекции *H. influenzae* (Hib) [42]. В дальнейшем были разработаны высокоэффективные конъюгированные вакцины для профилактики стрептококковой (*S. pneumoniae* тип 3) и менингококковой (*N. meningitidis*) инфекций. Конъюгированные полисахаридные вакцины обеспечили многократное снижение заболеваемости и смертности от указанных инфекций, особенно в детском возрасте [37].

Можно выделить три поколения носителей для конъюгированных вакцин. При этом, если первые два поколения применяются в полном объеме в клинической практике и являются продуктом первичной парадигмы, лежащей в основе создания конъюгированных вакцин, то разработка носителей третьего поколения является результатом появления нового знания в области иммунологии, в частности, новой информации о молекулярных адьювантах и ветвях иммунной системы, а также результатом переосмысления (пока не завершено) парадигмы, описывающей механизм адьювантного эффекта носителей и модификации иммунного ответа к полисахаридам в конъюгированных вакцинах.

Подбор белков-носителей первого поколения для конъюгированных вакцин носил практически исключительно эмпирический характер. Одним из основных аргументов в пользу выбора белка-носителя была возможность «эффективной индукции иммунного ответа как к полисахариду, так и к носителю». Уместно отметить, что в цитируемой работе белки-носители обозначались как «полезные» (useful) и «бессмысленные» (nonsense) с точки зрения

возможного использования иммунного ответа к носителю как дополнительного фактора защиты от распространенных инфекций [13].

Поэтому первые конъюгированные вакцины для защиты от *H. influenzae* типа b (Hib) чаще всего содержали в качестве белков-носителей дифтерийный и столбнячный токсиды (химически инактивированные дифтерийный — ДТ и столбнячный — ТТ токсины) [24]. Помимо указанных выше соображений, использование токсидов обуславливалось тем, что это были препараты уже разрешенные для использования в вакцинах — дифтерийной, столбнячной и комбинированной, заведомо являющиеся сильными антигенами [13]. К первому поколению носителей для конъюгированных вакцин можно отнести комплекс белков наружной мембраны *N. meningitidis* (ОМРС) и белок D *H. influenzae* [38].

Химическая инактивация токсинов, необходимая для их использования в качестве компонентов вакцины, снижает как иммуногенность белкового компонента, так и эффективность конъюгации, поскольку в результате обработки формальдегидом происходит модификация реакционно-способных аминогрупп, пригодных для «пришивки» полисахарида. Несмотря на эти недостатки, дешевизна и отработанные технологии получения химически инактивированных токсидов сделали их популярными носителями, которые применяются в современных конъюгированных вакцинах. На основе химически инактивированных токсидов и других антигенов первого поколения, создана широкая номенклатура вакцин к *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* типа b, неоднократно описанных в литературе [19]. При этом номенклатура белков-носителей для вакцин, одобренных к использованию в клинике, по-прежнему ограничена столбнячным и дифтерийным токсоидами, белком D *H. influenzae* и комплексом белков наружной мембраны (ОМРС) [38]: Ряд других бактериальных токсинов, таких как термолabile токсин *Escherichia coli* [3], также можно отнести к первому поколению носителей.

Второе поколение носителей для конъюгированных вакцин возникло благодаря достижениям в области генетики микроорганизмов, молекулярной микробиологии и генетической инженерии. Первые носители второго поколения представлены генетически детоксифицированными мутантами ДТ и ТТ. Инактивация токсичности достигалась за счет селекции микроорганизмов с мутациями в генах токсинов H21G или G52E для дифтерийного токсина и E234A/H237A в легкой цепи столбнячного токсина [4, 30]. Мутант ДТ под обозначением CRM197 (cross-reactive material 197 [47]) в настоящее время является единственным представителем второго поколения носителей в конъюгированных вакцинах, разрешенных к применению в клинической практике. Этот белок весьма широко применяется в качестве носителя в конъюгированных вакцинах и заслуживает подробного описания.

Генетически инактивированный ДТ в форме CRM197 не обладает АДФ-рибозилирующей активностью токсина дикого типа, однако сохраняет способность связываться с рецептором на поверхности клеток организма-хозяина [32]. Аминокислотная замена G52E вызывает структурные изменения в каталитической субъединице токсина, но не затрагивает рецептор-связывающую. Структурное различие мутанта и исходного токсина сосредоточено в подвижной петле активного центра, прикрывающей карман, связывающий НАД [30]. Минимальные изменения в CRM197 по сравнению с ДТ дикого типа сделали этот белок весьма востребованным партнером для конъюгации [12]. Мутантный ДТ получают различными способами — как за счет продукции в гомологичной системе (штамм *C. diphtheriae* C7; несущий бактериофаг β 197 [47]), так и путем суперпродукции в *E. coli* [44] или в *Pseudomonas fluorescens*, используя Pfenex Expression Technology (Pfenex Inc., San Diego, CA) [36].

Уместно отметить, что CRM197 — далеко не единственный мутант ДТ, который испытывался в качестве белка-партнера для конъюгированных вакцин. В литературе встречаются описания и других мутантных производных ДТ. Однако несмотря на то, что был получен целый ряд мутантов ДТ, существенно или полностью детоксифицированных (CRM107, 9, 176, 228, 45, 102, 103 и др.), эти белки либо обладают остаточной токсичностью (например, CRM9 и 107), либо содержат значительные делеции аминокислотной последовательности (в частности, CRM30 и 45) [12].

На основе CRM197 создан целый ряд конъюгированных вакцин, в частности, Menveo - четырехвалентные конъюгированные вакцины против серогрупп А-С-W135-Y.N.meningitidis, Menjugate (Novartis Vaccines and Diagnostics, Sienna, Italy), Meningitec (против серотипа С N. meningitidis) (Wyeth, Quebec, Canada), Vaxem-Hib и HibTITER (против Hib), поливалентная пневмококковая конъюгированная вакцина Prevenar [12, 30] и др.

Ко второму поколению белков-носителей для конъюгированных вакцин можно отнести также гЕРА — мутантный экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa*. Для детоксификации этого белка методами генетической инженерии был сконструирован токсоид, в котором остаток глутаминовой кислоты в 553 положении был делетирован методом сайт-направленного мутагенеза [29]. Имеются также данные о том, что при химической модификации белка дикого типа в процессе конъюгации также происходит полная потеря токсичности [15]. Несмотря на то, что гЕРА использовался для создания различных экспериментальных конъюгированных вакцин, в частности, брюшнотифозной [39], вакцин против шигелл [14], энтерогеморрагической *E. coli* [45] и, собственно, *P. aeruginosa* [15], до сих пор ни один из препаратов на основе этого белка окончательно не одобрен для использования в клинике.

Описан ряд других токсинов — потенциальных носителей для вакцинных конъюгатов. В частности, предлагается использование нетоксичных пептидных повторов токсина *Clostridium difficile*, однако эти работы также находятся на стадии фундаментальных исследований [41]. Более того, позитивные данные относительно эффективности конъюгированной брюшнотифозной вакцины на основе гЕРА соседствуют с критической оценкой эффективности этого белка в качестве носителя для конъюгированного полисахарида [39].

Одной из основных проблем выбора того или иного токсина для создания конъюгата является слабость теоретической базы, описывающей механизм адъювантного эффекта белка-партнера в составе конъюгированной вакцины. Многие годы с момента внедрения первых конъюгированных вакцин в клиническую практику в качестве механизма активации и модификации иммунного ответа конъюгированными углеводами по сравнению с неконъюгированными рассматривалось простое вовлечение активированных CD4+ Т-клеток в иммунный ответ и их помощь антигенспецифическим В-клеткам, в результате которой происходило переключение изотипов и формирование иммунологической памяти [31]. Такой упрощенный подход к пониманию механизма адъювантного эффекта белкового партнера в составе конъюгированных вакцин превалировал на протяжении десятков лет и носил, скорее, умозрительно-эмпирический характер, нежели опирался на подробные экспериментальные данные. Лишь в самые последние годы стали появляться работы, свидетельствующие о том, что механизм активации иммунного ответа к углеводной части конъюгата более сложный, чем представлялось ранее [34]. Вместе с тем, информация, полученная в ходе этих исследований, пока не позволяет целенаправленно модулировать иммунный ответ в конъюгатах для его усиления по отношению к полисахаридам. Нет также ясности в вопросе о влиянии дополнительных адъювантных эффектов тех белковых партнеров

для конъюгации, которые способны активировать различные ветви иммунной системы, в частности, врожденный иммунитет [33].

Иллюстрацией недостаточных фундаментальных исследований свойств белковых антигенов как носителей в конъюгированных вакцинах является вопрос иммунной интерференции, связанной с предшествующей вакцинации иммунизацией белками-носителями, в частности, в составе дифтерийно- столбнячных вакцин, а также возникающей при одновременной иммунизации различными конъюгированными вакцинами с общим носителем. Несмотря на то, что в ряде работ эффект интерференции описан в деталях], единая концепция иммунной интерференции («индуцируемой носителем эпитопной супрессии», CIES) полностью не разработана. Только в последние годы появилась информация, указывающая на преимущественную роль В-клеток в формировании CIES, что имеет важные последствия для конструирования новых вакцин и разработки усовершенствованных протоколов иммунизации [40].

Кроме классической иммунной интерференции существуют и другие эффекты взаимодействия углеводного и белкового компонентов в конъюгатах. Например, изменения иммуногенности конъюгата могут происходить от серотипа к серотипу для одного и того же патогена [27]. Различные белки-носители, равно как и особенности генетических вариантов иммунизируемых, также могут вносить вклад в эффективность иммунного ответа к конъюгированным вакцинам [1]. В свое время изучение феномена иммунной интерференции привело некоторых исследователей к парадоксальному на тот момент выводу о том, что наилучшим партнером для конъюгации был бы антиген, эффективно индуцирующий гуморальный иммунный ответ к полисахариду, но не к антигену-носителю [17]. На тот момент (1992 г.) механизм такого иммунного ответа было достаточно сложно представить. Однако изменения, происходящие в концепции иммуногенности носителя и механизма распознавания конъюгатов иммунной системой открывают перспективы систематического изучения механизма иммунного ответа к конъюгированным вакцинам, а следовательно — перспективы нахождения закономерностей, управляющих этим иммунным ответом.

Детальное описание изменений в парадигме механизма модификации иммунного ответа к полисахаридам, конъюгированным с белками-носителями, приводится в нескольких недавно опубликованных обзорных материалах [1, 6, 10]. Следует отметить, что в рамках новой концепции распознавания иммунной системой гликопептидных антигенов авторам удалось сконструировать конъюгат полисахаридного антигена *S. pneumoniae* с пептидом, представляющим собой Т-клеточный эпитоп овальбумина, который индуцировал иммунный ответ к патогену почти на два порядка более эффективно по сравнению с классическими конъюгатами [10]. Минимизация размера молекулы-носителя позволит ограничить число реакционно-способных групп для конъюгации с антигеном; тем самым, обеспечивая стандартизацию структуры и способа конъюгации композитного антигена, следовательно, создавая предпосылки для анализа закономерностей, обуславливающих ответ на конъюгированные антигены. С другой стороны, недавние успехи в иммунологии полисахаридов, позволившие идентифицировать минимальные антигенные структуры в больших полимерных молекулах, а с другой - в химии углеводов, обеспечивающей автоматический или полуавтоматический синтез олигосахаридов, обусловили создание химически детерминированных антигенов с возможностью их ориентированной химической или хемознзиматической «пришивки» к носителю в определенном положении [2]. Первая вакцина, содержащая синтетический углеводный компонент (конъюгированный с белковым носителем) была соз-

дана в 2003 г. [48]. В целом, упомянутые инновации будут способствовать созданию антигенов со стандартными, химически детерминированными характеристиками. Стандартизация, в свою очередь, не только обеспечит создание вакцин с высокой предсказуемостью свойств, но и позволит значительно снизить вклад неопределенности, вызванной химической гетерогенностью конъюгатов, в свойства вакцин. Необходимо отметить, что, несмотря на интенсивное изучение влияния химии конъюгации на эффективность иммунного ответа к конъюгату, сравнительный анализ для разных способов конъюгации и разных молекул весьма затруднен ввиду неопределенного числа молекул полисахарида и носителя, формирующих гетерогенные конъюгаты [20]. С другой стороны, вопросы структуры иммуногенного конъюгата, в частности, минимального размера углеводного полимера, необходимого для индукции эффективного иммунного ответа, а также способа «пришивки» олиго- или полисахарида к носителю, также относятся к неполностью изученным. Поэтому синтез стандартизованных как по сайту конъюгации, так и по структуре и молекулярному весу стандартизованных конъюгатов будет означать большой шаг вперед в изучении механизма иммунного ответа, и эффектов, привносимых в конъюгат как углеводным, так и белковым компонентами.

Прогресс в области конъюгированных вакцин может быть достигнут и в связи с новыми исследованиями в области взаимодействия различных антигенов и иммунной системы. В частности, в последние годы активно исследуются лиганды толл-подобных рецепторов, которые способны активировать врожденный иммунитет и тем самым служить эффективными молекулярными адьювантами, запускающими работу иммунного ответа к бактериальным антигенам. В частности, известным бактериальным белком, являющимся лигандом для толл-подобного рецептора TLR5, является бактериальный флагеллин из *S. typhimurium*. Было сделано предположение о том, что и использование FliC в качестве партнера для конъюгации может значительно повысить эффективность иммунного ответа к конъюгированному углеводному антигену [43]. Было предложено использование FliC в качестве адьюванта для создания вакцины против малярии, основанной на C-концевом фрагменте поверхностного белка-1 мерозоита *Plasmodium vivax* (MSP119) и агонисте - TLR5 [8].

Высокая эффективность иммунного ответа к конъюгатам с FliC может быть связана не только со способностью этого антигена активировать врожденный иммунитет, но и усиливать эффективность презентации антигена за счет повышенного уровня эндоцитоза и процессинга комплексов FliC с лигандом [9]. Другим интересным активатором иммунного ответа является холерный токсин, который также способен активировать врожденный иммунитет, а также CD8+ Т-лимфоциты и мукозальный иммунитет. Исследования конъюгатов полисахаридов с нетоксичной В-субъединицей холерного токсина проводятся достаточно давно, и можно ожидать значительного их расширения по мере накопления данных о механизме адьювантного эффекта холерного токсина [35, 50].

Фундаментальные исследования могут изменить не только парадигму механизма иммунного ответа к носителю, но и положение, согласно которому наиболее эффективным носителем для конъюгированного антигена является белковая молекула. Утверждение о том, что иммунный ответ к полисахаридам может быть только Т-независимым, было опровергнуто в процессе изучения ответа к цвиттерионным полисахаридам. Цвиттерионные полисахариды распознаются Т-клетками в контексте антигенпрезентирующих клеток и индуцируют классический Т-зависимый иммунный ответ. Более того, введение положительных зарядов в классические анионные бактериальные полисахара-

риды индуцировало их распознавание Т-клетками [18]. Уместно отметить, что цвиттерионные полисахарды теряют способность активировать иммунную систему в отсутствие толл-подобного рецептора TLR2, что дает дополнительные указания на важную роль агонистов рецепторов врожденного иммунитета в развитии иммунного ответа к различным вакцинным композициям [23].

Липополисахариды (ЛПС) являются лигандами для толл-подобного рецептора TLR4 и также рассматриваются в качестве антигенов для создания антибактериальных вакцин. Большим недостатком ЛПС является их реактогенность (известная как пирогенность), которая не позволяет использовать нативные липополисахариды для создания вакцинных препаратов. Однако разработка систем химической и особенно ферментативной детоксификации ЛПС значительно увеличивает ценность этих молекул для использования в качестве антигенов. В частности, монофосфорил липид А (MPLA), который является продуктом ферментативной деградации и связанной с ней депирогенизации некоторых видов ЛПС, является высокоэффективным адъювантом для создания как антибактериальных, так и противоопухолевых вакцин [10, 49].

Учитывая прогресс в изучении системы врожденного иммунитета, весьма вероятно появление новых антигенов, обладающих адъювантными свойствами и пригодных в качестве партнеров для создания конъюгированных вакцин. Значительный прогресс в области конъюгированных вакцин может быть достигнут в связи с тем, что гликоконъюгаты с белками или другими молекулами, обладающими сильной иммуногенностью и способностью активировать различные ветви иммунной системы, широко используются в экспериментальных противоопухолевых терапевтических вакцинах [21]. Работы по изучению механизма иммунного ответа к конъюгированным антигенам [1, 6, 10] выявили значительный пробел между информацией о противоопухолевых и антибактериальных конъюгатах, существующий несмотря на то, что оба типа конъюгатов призваны активировать иммунную систему человека и животных. В процессе создания вакцин данные, полученные при создании конъюгатов и при изучении взаимодействия антигенов (в том числе и бактериальных) с иммунной системой человека и животных, могут впоследствии использоваться для улучшения свойств антибактериальных препаратов, и, наоборот, эффективные схемы создания противоифекционных конъюгатов могут быть адаптированы для разработки противораковых средств [49]. Эти данные помогут расширить круг мишеней для конъюгированных антигенов [5] и сформировать фундамент для выработки универсальной концепции носителей и антигенов для конъюгированных вакцин.

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. Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. Современные представления о механизме активации иммунного ответа конъюгированными полисахаридными вакцинами. Журн. микробиол. 2015, 3: 97-106.
2. Adamo R., Nilo A., Castagner B. et al. Synthetically defined glycoprotein vaccines: current status and future directions. Chem. Sci. 2013, 4 (8): 2995-3008.
3. Andrade G.R., New R.R., Sant'Anna O.A. et al. A universal polysaccharide conjugated vaccine against O111 E. coli. Hum. Vaccin Immunother. 2014, 10 (10): 2864-2874.
4. Ashton A. C., Li Y., Doussau F. et al. Tetanus toxin inhibits neuroexocytosis even when its Zn⁽²⁺⁾-dependent protease activity is removed. Biol. Chem. 1995, 270 (52): 31386-31390.
5. Astronomo R.D., Burton D.R. Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? Nat. Rev. Drug. Discov. 2010, 9 (4): 308-324.

6. Avci F.Y. Novel strategies for development of next-generation glycoconjugate vaccines. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013, 13(20): 2535-2540.
7. Avery O. T., Goebel W. F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. *J. Exp. Med.* 1929, 50 (4): 533-550.
8. Bargieri D. Y., Rosa D. S., Braga C.J.M. et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FliC flagellin. *Vaccine.* 2008, 26: 6132-6142.
9. Bates J.T., Graff A.H., Phipps J.P. et al. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. *J. Immunol.* 2011, 186(11): 6255-6262.
10. Berti F., Adamo R. Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8(8): 1653-1663.
11. Blanchard-Rohner G., Pollard A. J. Long-term protection after immunization with protein-polysaccharide conjugate vaccines in infancy. *Expert. Rev. Vaccines.* 2011, 10 (5): 673-684.
12. Broker M., Costantino P., DeTora L. et al. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin: use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. *Biologicals.* 2011, 39 (4): 195-204.
13. Chu C., Schneerson R., Robbins J. B. et al. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 1983, 40 (1): 245-256.
14. Cohen D., Ashkenazi S., Green M.S. et al. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet.* 1997, 349 (9046): 155-159.
15. Cryz S.J., Jr., Sadoff J. C., Furer E. Octavalent *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. *Microb. Pathog.* 1989, 6 (1): 75-80.
16. Defrance T., Taillardet M., Genestier L. T cell-independent B cell memory. *Curr. Opin. Immunol.* 2011, 23 (3): 330-336.
17. Del Giudice G. New carriers and adjuvants in the development of vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 1992, 4 (4): 454-459.
18. Gallorini S., Berti F., Parente P. et al. Introduction of zwitterionic motifs into bacterial polysaccharides generates TLR2 agonists able to activate APCs. *J. Immunol.* 2007, 179 (12): 8208-8215.
19. Goldblatt D. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J. Med. Microbiol.* 1998, 47 (7): 563-567.
20. Grayson E. J., Bernardes G. J. L., Chalker J. M. et al. A coordinated synthesis and conjugation strategy for the preparation of homogeneous glycoconjugate vaccine candidates. *Angew. Chem. Intl. Ed.* 2011, 50: 4127-4132.
21. Guo Z., Wang Q. Recent development in carbohydrate-based cancer vaccines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13 (5-6): 608-617.
22. Jeurissen A., Bossuyt X. T cell-dependent and -independent responses. *J. Immunol.* 2004, 172 (5): 2728.
23. Kalka-Moll W.M., Tzianabos A.O., Bryant P.W. et al. Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions. *J. Immunol.* 2002, 169 (11): 6149-6153.
24. Knuf M., Kowalzik F., Kieninger D. Comparative effects of carrier proteins on vaccine-induced immune response. *Vaccine.* 2011, 29: 4881-4890.
25. Landsteiner K. *The specificity of serologic reactions.* Cambridge, MA: Harvard University Press, 1936.
26. Lee C. J., Lee L. H., Lu C. S., Wu A. Bacterial polysaccharides as vaccines - immunity and chemical characterization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001, 491: 453-471.
27. Leonard E. G., Canaday D. H., Harding C. V. et al. Antigen processing of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine carrier protein CRM197 differs depending on the serotype of the attached polysaccharide. *Infect. Immunity.* 2003, 71 (7): 4186-4189.
28. Lesinski G. B., Westerink M. A. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J. Microbiol. Methods.* 2001, 47 (2): 135-149.
29. Lukac M., Pier G.B., Collier R.J. Toxoid of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A generated by deletion of an active-site residue. *Infect. Immun.* 1988, 56 (12): 3095-3098.

30. Malito E., Bursulaya B., Chen C. et al. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *PNAS*. 2012, 109 (14): 5229-5234.
31. McCool T. L., Harding C. V., Greenspan N. S., Schreiber J. R. B- and T-cell immune responses to pneumococcal conjugate vaccines: divergence between carrier- and polysaccharide-specific immunogenicity. *Infect. Immun.* 1999, 67 (9): 4862-4869.
32. Mitamura T., Higashiyama S., Taniguchi N. et al. Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 1995, 270 (3): 1015-1019.
33. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol.* 2010, 185 (10): 5677-5682.
34. Muthukumar S., Stein K. E. Immunization with meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate induces polysaccharide-reactive T cells in mice. *Vaccine*. 2004, 22 (9-10): 1290-1299.
35. Olvera-Gomez I., Hamiltona S.E., Xiaoa Z. et al. Cholera toxin activates nonconventional adjuvant pathways that induce protective CD8 T-cell responses after epicutaneous vaccination. *PNAS*. 2012, 109 (6): 2072-2077.
36. Patent EP 2533805 A1, 19.12.2012. Caulfield M.J., Ahl P.L., Blue J.T., Cannon J.L. 15-valent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine composition. Patent USA, EP20110742633, 2011.
37. Pollard A. J., Perrett K. P., Beverley P. C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* 2009, 9 (3): 213-220.
38. Pichichero M. E. Protein carriers of conjugate vaccines. *Human Vaccines Immunotherapeutics*. 2013, 9 (12): 2505-2523.
39. Pier G.B. Is *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A a good carrier protein for conjugate vaccines? *Human Vaccines*. 2007, 3 (2): 39-40.
40. Pobre K., Tashani M., Ridha I. et al. Carrier priming or suppression: understanding carrier priming enhancement of anti-polysaccharide antibody response to conjugate vaccines. *Vaccine*. 2014, 32 (13): 1423-1430.
41. Romano M.R., Leuzzi R., Cappelletti E. et al. Recombinant *Clostridium difficile* toxin fragments as carrier protein for PSII surface polysaccharide preserve their neutralizing activity. *Toxins (Basel)*. 2014, 6 (4): 1385-1396.
42. Shapiro E. D. New vaccines against *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr. Clin. North. Am.* 1990, 37 (3): 567-583.
43. Simon R., Wang J.Y., Boyd M.A. et al. Sustained protection in mice immunized with fractional doses of *Salmonella enteritidis* core and O polysaccharide-flagellin glycoconjugates. *PLoS One*. 2013, 8 (5): e64680.
44. Stefan A., Conti M., Rubboli D. et al. Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology*. 2010, 156: 245-252.
45. Szu S.C., Ahmed A. Clinical studies of *Escherichia coli* O157:H7 conjugate vaccines in adults and young children. *Microbiol. Spectr.* 2014, 2 (6): 1-7.
46. Taillardet M., Haffar G., Mondière P. et al. The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood*. 2009, 114 (20): 4432-4440.
47. Uchida T., Gill D.M., Pappenheimer A.M. Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage β . *Nature New Biology* 1971, 233: 8-11.
48. Verez-Bencomo V., Fernandez-Santana V., Hardy E. et al. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science*. 2004, 305 (5683): 522-525.
49. Wang Q., Zhou Z., Tang S. et al. Carbohydrate-monophosphoryl lipid a conjugates are fully synthetic self-adjuvanting cancer vaccines eliciting robust immune responses in the mouse. *ACS Chem. Biol.* 2012, 7 (1): 235-240.
50. Wiedinger K., Romlein H., Bitsaktsis C. Cholera toxin B induced activation of murine macrophages exposed to a fixed bacterial immunogen. *Ther. Adv. Vaccines*. 2015, 3 (5-6): 155-163.

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