

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Обзор

© 2023 Ю.А. Ходак

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии,
117312 Москва, Россия; электронная почта: salix33@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2023

После доработки 30.06.2023

Принята к публикации 25.07.2023

Использование белков-носителей, индуцирующих эффективный и долгосрочный иммунный ответ на слабые антигены, стало настоящим прорывом в вакцинопрофилактике, сделавшим её доступной для более широкого круга пациентов и позволившим получить надёжные препараты против множества возбудителей. В настоящее время продолжаются исследования как по выявлению новых пептидов, белков и их комплексов, потенциально пригодных для использования в качестве носителей, так и по разработке новых методов выделения, очистки и конъюгации уже известных и хорошо себя зарекомендовавших белков. Использование рекомбинантных белков имеет ряд преимуществ перед выделением из природных источников: более простое культивирование организма-хозяина, возможность модификации генетической конструкции, использование многочисленных вариантов промоторов, сигнальных последовательностей и прочих регуляторных элементов. Данный обзор посвящён способам получения как «традиционных», так и новых рекомбинантных белков и их производных, используемых или потенциально пригодных для использования в качестве белков-носителей конъюгированных вакцин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетерологичная экспрессия рекомбинантных белков, конъюгированные вакцины, белки-носители.

DOI: 10.31857/S0320972523090051, **EDN:** WTMAUF

ВВЕДЕНИЕ

При разработке современных вакцин для обеспечения сильного и длительного иммунного ответа при минимальном количестве побочных эффектов из массы отдельных антигенов инфекционных микроорганизмов отбирают те, которые обладают наибольшим протективным действием. Однако подобная процедура может привести к значительному снижению иммуногенности, поскольку наиболее доступные для взаимодействия с клетками иммунной системы молекулы зачастую сами по себе являются слабыми иммуногенами. Использование белков-носителей и

их производных в составе конъюгированных вакцин позволяет, с одной стороны, сохранить узкую, наиболее характерную антигенную специфичность патогена, а с другой стороны – обеспечивает достаточную иммуногенность для выработки сильного протективного иммунитета.

При производстве конъюгированных вакцин важным фактором является возможность широкомасштабного производства как антигенов, так и носителей. Следует отметить, что большинство используемых или потенциальных носителей удобнее получать с помощью генноинженерных технологий в виде рекомбинантных белков и производных, поскольку

Принятые сокращения: DT – дифтерийный токсин; CRM197 – нетоксичный мутант дифтерийного токсина; GMMA – модули мембранных антигенов; H1b – *Haemophilus influenza* типа b; OMPC – комплекс белков внешней мембраны; OMV – везикулы внешней мембраны; PD – белок D *Haemophilus influenza*; TT – столбнячный токсин; VLP – вирусоподобные частицы.

* Адресат для корреспонденции.

системы гетерологичной экспрессии позволяют получать большие или сопоставимые с природными продуцентами количества целевого продукта в нетоксичной форме из малопатогенных организмов, культивирование которых обходится дешевле. Так, в состав многих существующих вакцин входят химически инактивированные природные токсины (анатоксины). Их использование сопряжено с рядом неудобств, таких как необходимость культивирования опасных микроорганизмов, очистка и обработка полученных токсичных белков формальдегидом, опасность их недостаточной инактивации и денатурации, а также потенциальная гетерогенность партий и возможность нежелательных побочных модификаций. Получение мутантных нетоксичных производных, сохранивших антигенные эпитопы, но лишённых ферментативной активности, позволяет как избежать вышеперечисленных затруднений, так и организовать производство белков в менее опасных и более простых для культивирования микроорганизмах, что значительно снижает стоимость конечной продукции. Изменение белкового и липидного составов мембранных везикул для уменьшения их токсичности и повышения иммуногенности требует вмешательства в геном клеток-продуцентов, что также позволяет отнести такие носители к рекомбинантным. Не меньшего количества манипуляций требует и создание продуцентов биоконъюгатных вакцин, когда конъюгация носителя с антигеном осуществляется с помощью ферментативных реакций внутри клетки-хозяина, что также позволяет снизить стоимость производства конечного продукта. Таким образом, гетерологичная экспрессия является мощным инструментом, использование которого даёт возможность нарабатывать большие объёмы продукта быстрее, безопаснее и дешевле. Несмотря на значительное количество обзоров, посвящённых свойствам и многообразию существующих и разрабатываемых носителей, в них редко затрагиваются вопросы экспрессии рассматриваемых белков, в том числе в гетерологичных системах. При этом многие рассматриваемые белки являются довольно сложными объектами для гетерологичной экспрессии из-за сложностей с фолдингом, необходимости посттрансляционного процессинга, токсичности и цитотоксичности. Настоящий обзор призван дать представление о разнообразии приёмов, используемых при гетерологичной экспрессии белков и их производных, используемых в качестве носителей конъюгированных вакцин.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Внешняя оболочка многих инфекционных агентов, таких как *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* и другие, покрыта полисахаридной капсулой, которая способствует их выживанию в кровотоке, придавая устойчивость к опосредованному комплементом уничтожению и фагоцитозу [1, 2]. Зачастую составляющие её полисахариды являются единственными поверхностными антигенами, непосредственно доступными для взаимодействия рецепторам клеток адаптивного иммунитета [3], что делает привлекательным их использование в качестве вакцин [4–6]. Однако полисахариды, за исключением цвиттер-ионных, обладают слабыми антигенными свойствами [6, 7].

Повторяющиеся звенья полисахаридных молекул напрямую взаимодействуют с рецепторами В-лимфоцитов, запуская процесс их дифференцировки в плазматические клетки. Активированные В-клетки синтезируют IgM — пентамерные антитела, обладающие большой авидностью, но низкой аффинностью. Таким образом, иммунный ответ на полисахариды идёт по Т-независимому пути, который не позволяет запускать механизм созревания В-клеток, сопровождающийся увеличением аффинности вырабатываемых антител. Кроме того, у детей первого года жизни данный механизм не сформирован, что делает невозможной вакцинопрофилактику полисахаридными вакцинами. Описанные ограничения можно преодолеть путём ковалентного присоединения полисахаридных антигенов к белкам, которые способны привлекать Т-лимфоциты и активировать Т-зависимый путь. В гликоконъюгированных вакцинах полисахаридная часть отвечает за привлечение специфических В-клеток, а белок-носитель предоставляет эпитопы для CD4⁺ Т-хелперов, способных запускать механизм созревания В-клеток, а также способствует переключению изотипов синтезируемых антител с IgM на IgG [6, 8].

Полисахаридная часть гликопротеина связывается с рецепторами В-клеток, а после интернализации антигена антиген-презентирующими клетками белковая часть подвергается процессингу, в результате которого пептиды презентуются в составе главного комплекса гистосовместимости (МНС II) хелперным Т-лимфоцитам. С помощью Т-лимфоцитов запускается процесс пролиферации и дифференциации В-клеток в плазматические клетки, синтезирующие большое количество высоко-

аффинных IgG, а также в клетки иммунологической памяти. Последние при повторном появлении антигена способны быстро пролиферировать и дифференцироваться в плазматические клетки, обеспечивающие высокий титр специфических антител. Кроме того, описан и второй механизм иммунного ответа на гликоконъюгаты — процессированный гликопептид удерживается на МНС II за пептидную часть, а его углеводная составляющая экспонируется и узнаётся рецепторами углеводоспецифических клонов Т-лимфоцитов, также способных к стимуляции В-клеток. Оба этих механизма запускают функционирующий с рождения Т-зависимый иммунный ответ, что позволяет осуществлять вакцинацию детей с самого раннего возраста [6, 8]. Таким образом, использование конъюгированных вакцин может значительно повысить эффективность и безопасность вакцинопрофилактики.

НОСИТЕЛИ «ТРАДИЦИОННЫЕ» И НОВЫЕ

Белки-носители должны соответствовать ряду требований, таких как безопасность для пациента, стабильность при хранении, способность вступать в реакции конъюгации, высокая иммуногенность конъюгата и возможность широкомасштабного производства. Токсичность белков-носителей устраняют химическим или генноинженерным способами. Кандидатный белок должен обладать достаточным количеством аминокислотных остатков с экспонированными боковыми цепями, способными вступать в реакции конъюгации с полисахаридом, обладать хорошей растворимостью в используемых буферах и быть стабильным в растворах с высокой концентрацией белка и полисахарида. Также немаловажными факторами являются стоимость культивирования и очистки. Данные процессы должны обладать высоким выходом и хорошей воспроизводимостью, соответствовать стандартам GMP, а конечный продукт — обладать высокой чистотой и быть стабильным при хранении [8].

Наиболее распространённые белки, на основе которых созданы используемые в настоящее время лицензированные вакцины, получили условное название «традиционные носители». Это пять препаратов: химически инактивированные столбнячный и дифтерийный токсины (TT и DT соответственно) [9, 10], нетоксичный мутант дифтерийного токсина CRM197 [11, 12], D-белок *Haemophilus influenzae* (PD или HiD) [13], а также комплексы бел-

ков внешней мембраны *Neisseria meningitidis* серогруппы В (outer membrane protein complex, OMPC) [14, 15]. Известные специфические антигены для данных носителей — преимущественно капсульные полисахариды пневмококков, менингококков и *H. influenzae* типа b (Hib) [16]. Для создания конъюгатов с новыми антигенами производители вакцин в подавляющем большинстве случаев используют эти «традиционные» носители. Такой подход ограничен непредсказуемым изменением иммуногенности прототипов вакцин с одинаковым белком и полисахаридами разных типов [17, 18]. Были описаны случаи как усиления иммунного ответа при введении различных полисахаридных антигенов с одинаковым белком-носителем, так и его снижения по причине иммунной интерференции. Исследования новых белков и их производных на предмет возможности их использования в качестве носителей, а также разработка способов их очистки и конъюгации активно продолжаются.

Разработку новых носителей можно разделить на три направления. Первое — новые белки, чаще всего белки внешней поверхности бактерий или секретируемые токсины, которые соответствуют требованиям к белкам-носителям. Второе — мультимерные трансмембранные белковые комплексы на основе как везикул внешней мембраны (OMV, outer membrane vesicles) и модулей мембранных антигенов (GMMA, generalized modules for membrane antigens), так и вирусоподобных частиц (VLP, virus-like particles) и нанокapsул (nanocages) — вирусоподобных структур из невирусных белков. Третье — пептиды и слитные белки, представляющие собой отдельные эпитопы и их комбинации соответственно [6, 8, 16, 19]. Отдельно стоит отметить направление получения био-конъюгатов, синтезируемых внутри генетически модифицированных бактериальных клеток: внутриклеточные ферменты осуществляют перенос широкого спектра полисахаридных субстратов на белки-носители, обладающие коротким специфическим аминокислотным мотивом [20].

Далее будут более подробно рассмотрены способы получения как «традиционных», так и новых носителей.

ДИФТЕРИЙНЫЙ ТОКСИН И CRM197

Дифтерийный токсин — это секретруемый белок, синтезируемый микроорганизмом *Corynebacterium diphtheriae*, который можно условно разделить на два фрагмента.

N-Концевой фрагмент А отвечает за каталитическую активность. Фрагмент В содержит два домена, отвечающих за связывание с рецептором и рН-зависимое встраивание белка в мембрану и транслокацию внутри клетки-мишени. Токсин интернализуется в эндосомах и покидает их при закислении среды путём конформационной перестройки. В цитозоле DT блокирует синтез белка, воздействуя на эукариотический фактор элонгации EF-2 и таким образом убивает клетку. В молекуле DT две дисульфидные связи: Cys186–Cys201 соединяет фрагменты А и В, а Cys461–Cys471 расположена внутри фрагмента В [11, 21, 22]. Инактивированный обработкой формальдегидом анатоксин DT входит в состав вакцин с полисахаридами *H. influenzae* типа b (ProHIBIT), *N. meningitidis* (Menactra) и *Str. pneumoniae* (Synflorix). Также описана попытка получения фрагмента дифтерийного токсина в составе комплексного препарата против дифтерии, столбняка и коклюша из трансгенных растений табака с пониженным содержанием алкалоидов [23].

CRM197 – это нетоксичный мутант DT, полученный одной аминокислотной заменой G52E в активном центре фермента [11, 24–27]. Способность к химической конъюгации CRM197 несколько выше, чем у интактного DT, что может быть вызвано открытой конформацией белка и облегчением доступа к большему количеству остатков лизина [11, 18, 28]. В настоящее время CRM197 используется во многих широко применяющихся вакцинах, таких как Meningitec («Nuron Biotech», США), Menjugate («GSK Vaccines», Великобритания), Menveo («GSK Vaccines»), Prevnar 13 и Prevnar 20 («Pfizer», США), Vaxneuvance («Merck», Германия), а также и для разработки новых вакцин против различных патогенов [29].

Значительная часть производимого в мире CRM197 представляет собой продукт культивирования нетоксичного штамма *C. diphtheriae* C7(β197) [11]. Этим способом получает CRM197 компания «List Biological Labs» (США). Преимуществами данного способа являются правильная укладка целевого белка и его секреция в среду для культивирования, что облегчает дальнейшую очистку продукта. В настоящее время продолжают исследования по повышению продуктивности *C. diphtheriae* C7(β197) с помощью подбора состава сред и режимов культивирования [30–32]. Гомологичная экспрессия обладает рядом недостатков, таких как сравнительно невысокая продуктивность коринебактерий (в среднем 175–250 мг/литр [33]), низкая скорость роста *C. diphtheriae*, риск об-

ратной мутации в токсичный вариант и необходимость соблюдать повышенные требования безопасности при культивации патогенных микроорганизмов. Поэтому предпринимались многочисленные попытки экспрессии CRM197 в иных организмах (табл. 1).

Наличие внутри CRM197 двух дисульфидных связей является основной проблемой, затрудняющей его гетерологичную экспрессию. Не все организмы способны осуществлять правильную укладку таких белков, из-за чего некорректно свёрнутый продукт становится нерастворимым и формирует тельца включения. В этом случае для получения растворимого препарата требуется процедура рефолдинга. Кроме того, в исходной последовательности белка присутствует лидерный пептид, позволяющий *C. diphtheriae* осуществлять секрецию синтезированного токсина во внешнюю среду. В зависимости от продуцента данную последовательность либо заменяют на более эффективную, либо удаляют.

Было разработано несколько бактериальных систем для гетерологичной экспрессии CRM197. Грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* [34], несущие плазмиду, кодирующую ген *crm197*, слитый с сигнальной последовательностью субтилизина, давали максимальное содержание растворимого секретиремого CRM197 в среде ~7,1 мг/литр. Также в качестве организма-хозяина использовали штамм грамотрицательной бактерии *Pseudomonas fluorescens* (WO 2011123139 A1 [46]), дефектный по генам протеаз (*hslU*, *hslV*, *prcl*, *degP1*, *degP2*, *dprA*) и сerratилина, и сверхэкспрессирующий дисульфидизомеразы DsbA, DsbB, DsbC и DsbD. Последовательность гена оптимизировали под экспрессию в *Pseudomonas* и сливали с сигнальными последовательностями, направляющими синтезируемый белок в периплазму, где происходила правильная укладка продукта. Для по крайней мере трёх вариантов сигнального пептида выход правильно сложенного CRM197 составил более 1 г/литр. Менее удачный опыт был описан при попытке получения назальной формы вакцины против дифтерии с использованием ослабленного штамма *S. enterica* серовар Typhi CVD 908-htrA, поскольку большая часть целевого продукта синтезировалась в нерастворимой форме и находилась в тельцах включения. Также неудачей окончилась попытка получения в данном продуценте секретиремого CRM197 путём экспрессии белка, слитого с укороченной версией гемолизина A *Escherichia coli* [35]. Обычно гетерологичную экспрессию рекомбинантного CRM197 проводят в раз-

Таблица 1. Экспрессия рекомбинантных производных дифтерийного токсина

Продуцент	Последовательность гена	Рекомбинантный белок	Плазмида	Промотор	Свойства/продуктивность	Особенности	Ссылка
<i>Bacillus subtilis</i> штаммы SMS118 и SMS300	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> C7 (β197)	CRM197, DT-del (148) и DT (E148S, K516A, F530A)	pSM604	промотор протеиназы <i>B. subtilis</i>	растворимый секретуемый/ 2,3 мг/литр в SMS118 и 7,1 мг/литр в SMS300	сигнальная последовательность субтилизина	[34]
<i>Salmonella enterica</i> серovar Typhi CVD 908-htrA	фаг β197	CRM197 и его фрагменты	производная pBR322, pMOhy	Pnir15	нерастворимые/низкая во всех случаях		[35]
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>C. diphtheriae</i>	фрагмент DT	pBIV-1.3Tag	RbcS1	растворимый/примерно 0,4 мг/кг биомассы	модуль для аффинного выделения	[23]
<i>Escherichia coli</i> BL21AI	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET9a	T7	нерастворимый/ 250 ± 50 мг/литр для CRM197 с His6-модулем	модуль для аффинного выделения и без него	[36]
<i>E. coli</i> Origami B(DE3), Origami 2(DE3) и Rosetta-gami B(DE3) pLysS	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	производная pET32a	T7	растворимый/ 150,69 ± 8,95 мг/литр	различные модули для аффинного выделения	[37]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET28a	T7	нерастворимый/ 250 ± 30 мг/литр		[38]
<i>E. coli</i> B834(DE3), LR(DE3) и HMS174(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	производная pET26b, pRIT16681	T7	периплазматический растворимый/ более 3 г/литр	исследовали различные сигнальные последовательности	[39]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) и Rosetta-gami 2(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET-28a	T7	растворимый/ 110,5 ± 7,5 мг/литр	в том числе с модулем для аффинного выделения	[40]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pTWIN 1	T7	нерастворимый		[41]
<i>E. coli</i> ClearColi BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET28a (+)	T7	нерастворимый/ 125 мг/г биомассы	слитый с модулем для аффинного выделения	[42]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET32a (+)	T7	растворимый		[43]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET26b (+)	T7	нерастворимый/ 7,88 г/литр		[44]
<i>E. coli</i> SHuffle® T7	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	производная pET28a	T7	растворимый/ 150–270 мг/литр (1,1–2,0 мг/г биомассы)		[45]

личных штаммах *E. coli*, и основной проблемой получения растворимого CRM197 остаётся правильная укладка полипептидной цепи, поскольку окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы *E. coli* не позволяет формировать дисульфидные связи. Корректно свёрнутый рекомбинантный CRM197 может быть получен путём ренатурации телец включения. Варианты рефолдинга описаны в многочисленных публикациях [36, 38, 41, 42, 47, 48] и патентах WO 2010150230 A1 [49], WO 2019151601 A1 [50], WO 2016079755 A1 [51], CN 100999548 A [52], CN 101265288 B [53], CN 103266125 A [54], CN 104140972 B [55]; однако в большинстве случаев данный процесс требует существенного разбавления целевого белка и занимает несколько суток. Вариант рефолдинга с щелочной денатурацией CRM197 и последующей нейтрализацией путём быстрого смешивания полученного раствора с кислотой также даёт низкий (не более 20%) выход (WO 2017081700 A1 [56]). По-видимому, процесс рефолдинга позволяет получать CRM197 с правильно свёрнутым гидрофобным ядром [41], но не обеспечивает корректную пространственную структуру всей белковой глобулы CRM197, что подтверждается нестабильностью рефолдированного продукта при хранении [42].

В литературе описаны две основные группы методов получения правильно свёрнутого растворимого CRM197. Первая из них — экспрессия целевого белка, сопряжённая с его секрецией в периплазматическое пространство. Она имеет ряд преимуществ, таких как корректное отщепление лидерного пептида, а также меньшее содержание в периплазматической фракции примесных белков и протеаз, что облегчает дальнейшую очистку ([39], а также патенты WO 2015134402 A1 [57], WO 2011042516 A2 [58], WO 2014102265 A1 [59], US 20150184215 A1 [60], WO 2019035058 A1 [61]). Основными преимуществами данного способа являются окислительный потенциал периплазмы, благоприятный для правильного сворачивания CRM197, и наличие там дисульфидизомераз DsbA и DsbC [62]. Однако ряд недостатков снижает привлекательность данного способа. Малый объём периплазмы (не более 15% относительно объёма клетки [63]) снижает конечный выход белка в расчёте на полученную биомассу. Но основной сложностью при использовании периплазматической экспрессии является обеспечение её согласованности с процессом секреции во избежание накопления в цитоплазме избытка непротессированного нерастворимого продукта ([39], WO 2019035058 A1 [61]), а также сложности

в отделении примеси непротессированного (несущего лидерный пептид) белка, неизбежно появляющейся при механическом повреждении клеток в процессе обработки большой биомассы методом осмотического шока. Невозможность заморозки и необходимость неотложной обработки биомассы также значительно усложняют масштабирование производства.

Таким образом, цитоплазматическая экспрессия CRM197 представляется более многообещающим методом. Однако, как упомянуто выше, восстановительный потенциал цитоплазмы существенно затрудняет формирование правильно свёрнутых молекул CRM197. Данные сложности можно преодолеть путём совместной экспрессии целевого белка с шаперонами или дисульфидизомеразами и экспрессией в коммерчески доступных штаммах *E. coli* с изменённым окислительно-восстановительным потенциалом цитоплазмы — например, Origami™ («EMD Millipore», США) или SHuffle™ («New England Biolabs», США), а также комбинации этих методов. Штамм SHuffle™ конститутивно экспрессирует в цитоплазме дисульфидизомеразу DsbC, выполняющую также функции шаперона, и дефектен по генам тиоредоксинредуктазы (*trxB*) и глутатионредуктазы (*gor*), благодаря чему окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы изменяется, что позволяет обеспечить суперэкспрессию растворимого CRM197 ([45], WO 2015117093 A1 [64]). Следует отметить, что индукция при пониженной температуре увеличивает выход корректно свёрнутого CRM197, тормозя скорость синтеза белка и обеспечивая дополнительное время для правильного сворачивания. Совместная экспрессия шаперонов с целевым белком в штамме Origami B(DE3), результатом которой является синтез растворимого CRM197, описана в работе Mahamad et al. [37]. Использование штамма Rosetta-gami 2(DE3) с изменённым окислительно-восстановительным потенциалом цитоплазмы не помогло получить растворимый CRM197. Однако в клетках *E. coli* BL21(DE3) удалось добиться приемлемого ($110,5 \pm 7,5$ мг/литр) уровня синтеза растворимого целевого белка за счёт экспрессии с отдельной плазмиды дополнительных шаперонов в виде сульфгидрилоксидазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Erv1p) и дисульфидизомеразы (PDI) из клеток человека [40].

Из рассмотренного разнообразия методов можно сделать вывод, что поскольку рефолдинг нерастворимого CRM197 идёт неэффективно, основной задачей при разработке

систем гетерологичной экспрессии является обеспечение его правильной укладки. Наиболее привлекательным с точки зрения очистки способом получения белков является выделение из культуральной жидкости. Однако создать гетерологичную систему, уровень экспрессии секретируемого белка в которой сопоставим или превышает таковой в организме-хозяине, не удалось. Периплазматическая экспрессия позволяет получать растворимый CRM197, однако малый объём периплазмы, а вследствие этого невысокий выход, необходимость немедленной переработки клеточной массы и дополнительная задача отделения примеси белков с неудалённым лидерным пептидом делают данный способ малопривлекательным. К преимуществам цитоплазматической экспрессии можно отнести возможность накопления большого количества белка и отсутствие дополнительных последовательностей (лидерного пептида), неэффективный процессинг которых может усложнить очистку. Дополнительным аргументом в пользу цитоплазматической экспрессии CRM197 является возможность получения растворимого целевого белка в коммерчески доступных штаммах одного из самых распространённых организмов-продуцентов, *E. coli*, без необходимости серьёзного вмешательства в его геном, что ускоряет и удешевляет получение новых штаммов-продуцентов. Однако значительное повышение уровня синтеза цитоплазматического белка может привести к его накоплению в нерастворимой форме в тельцах включения. Таким образом, разработка новых и оптимизация уже существующих систем цитоплазматической экспрессии CRM197 остаётся актуальной задачей.

СТОЛБНЯЧНЫЙ ТОКСИН (ТТ)

Столбнячный токсин (tetanus toxin) синтезируют анаэробные бактерии *Clostridium tetani* в виде белка-предшественника, который затем превращается в активный токсин путём протеолиза: *N*-концевая часть становится каталитически активной лёгкой цепью (LC или фрагмент А), а соединённая с нею дисульфидной связью *C*-концевая часть становится тяжёлой цепью (HC) токсина. Тяжёлая цепь, в свою очередь, состоит из транслокационного (HCN или фрагмент В) и рецептор-связывающего (HSC или фрагмент С) доменов [65]. Проникая в нейроны, ТТ блокирует экзоцитоз нейромедиаторов, предотвращая высвобождение ингибиторов нервно-мышечных синапсов, что

приводит к продолжительной нервно-мышечной активации и спастическому параличу [66].

В настоящее время наиболее распространённым способом получения ТТ является его выделение из среды для культивирования Гарвардского штамма («Harvard strain») *C. tetani*, полученного в США в 1920-х гг. и постепенно распространившегося в качестве основного продуцента в научных лабораториях и на производстве вакцин [67]. Бактериальный токсин очищают от клеток и компонентов среды методом фильтрации и далее инактивируют формальдегидом, получая каталитически неактивный столбнячный анатоксин (catalytically inactive tetanus toxoid, CITT) [68, 69]. Полученные препараты иммунологически эффективны, но содержат значительные примеси белков штамма-продуцента. Кроме того, содержание ТТ колеблется от партии к партии. Данные обстоятельства приводят к довольно частым побочным эффектам после введения вакцины [9].

Получение рекомбинантного столбнячного анатоксина сопряжено с рядом трудностей. Поскольку для поддержания структуры ТТ необходимы две правильно сформированные дисульфидные связи, проблемы гетерологичной экспрессии данного белка весьма сходны с описанными выше для CRM197. Дополнительным фактором, усложняющим получение продукта, является протеолиз, необходимый для переноса синтезированного полипептида в зрелую форму. Кроме того, в последовательность ТТ необходимо внести изменения, блокирующие токсическую активность, но не влияющие на его иммунные свойства.

Одним из способов обойти указанные препятствия является использование отдельных функциональных фрагментов столбнячного токсина, несущих сохранённые эпитопы, но не обладающих токсической активностью и не требующих для своего функционирования формирования дисульфидных связей и расщепления протеазой. С иммунологической точки зрения, столбнячный токсин интересен своими многочисленными эпитопами для взаимодействия с Т-клетками [70]. Например, последовательность P2 (а.о. 830–844) является универсальным CD4⁺ Т-клеточным эпитопом. Его последовательность в составе слитных белков и пептидов значительно повышает эффективность вакцинных препаратов против малярии [71], ротавируса [72] и коронавируса [73]. Рецептор-связывающий *C*-фрагмент тяжёлой цепи столбнячного токсина востребован не только в качестве антигена противостолбнячных вакцин, но и в фундаментальных исследованиях физиологии нейронов и нервной системы.

Также С-фрагмент используют в качестве носителя для создания широкого спектра противоопухолевых препаратов и гликоконъюгатов, поэтому разработано и запатентовано огромное количество систем для его гетерологичной экспрессии, включая экспрессию в *E. coli* и других бактериях, а также в дрожжах и клетках насекомых [10].

Полноразмерный токсин получали реконструкцией отдельно экспрессированных цепей в 2 М мочеvine в присутствии дитиотреитола [74, 75]. Было отмечено, что полученный белок примерно в 40 раз менее токсичен, чем его природный аналог. В то же время инъекции смеси не подвергнутых реконструкции цепей показали отсутствие токсичности даже в больших дозах. Однако больший практический интерес представляет получение генетически инактивированного анатоксина, что, учитывая крайне высокую степень токсичности ТТ, является нетривиальной задачей. В отличие от CRM197, исследователям не удалось найти единственную аминокислотную замену, кардинально снижающую токсичность до приемлемого уровня.

Протеазную активность ТТ пытались подавить путём ввода в каталитический домен замены E234A. Поскольку *E. coli*, в которой осуществляли гетерологичную экспрессию мутантного токсина, неспособна к правильному процессингу синтезируемого полипептида, его расщепление осуществляли с помощью энтерокиназы, сайт узнавания которой вводили в дополнительную линкерную последовательность между лёгкой и тяжёлой цепями. Полученный мутантный белок блокировал нейрпаралитическое действие столбнячного токсина *in vitro* с той же эффективностью, как тяжёлая цепь токсина, однако оказался более чем в 30 раз эффективнее в опытах *in vivo*, предотвращая развитие столбняка у мышей, а его токсичность была значительно снижена [76]. Замены R372A и Y375F в том же каталитическом домене позволили получить мутантный вариант TeNT(RY), который сохранил способность связываться с ганглиозидами с той же аффинностью и специфичностью, что и исходный белок, однако его токсичность оказалась в 125 000 раз ниже. Данный белок, слитый с модулями, позволяющими осуществлять его аффинное выделение и мечение, использовали для исследований взаимодействия токсина с культурами клеток, поскольку остаточная токсичность его была всё ещё неприемлема для использования в составе вакцинных препаратов [77]. Приемлемый уровень токсичности производного ТТ был достигнут при

внесении изменений во все три домена токсина. Полученный белок, названный 8MTT, содержит пять замен в лёгкой цепи (Y26A, L230K, E234Q, R372A, Y375F), которые нарушают каталитическую функцию и взаимодействие с белками-мишенями. Кроме того, были внесены мутации, нарушающие функционирование транслокационного (K768A) и рецептор-связывающего (R1226L и W1289A) доменов. Токсичность 8MTT снижена более чем в 50 млн раз относительно исходного столбнячного токсина, что делает его хорошим кандидатом для использования в качестве компонента вакцинных препаратов [78]. Повысить эффективность гетерологичной экспрессии 8MTT удалось благодаря использованию в качестве продуцента штамма Gor/MetTM *E. coli* [79] с удалённым геном глутатионредуктазы (*gor*), благодаря чему его цитоплазма имеет окислительный потенциал, позволяющий получить растворимые белки с правильно сформированными дисульфидными связями. Кроме того, в данном штамме *gor*-локус заменён на ген метионинаминопептидазы под контролем *tac*-промотора. Таким образом, при добавлении индуктора целевой ген, находящийся в плазмиде под контролем того же промотора, начинает экспрессировать продукт одновременно с экспрессией аминопептидазы, отщепляющей с N-конца синтезируемого белка стартовый остаток метионина. Поскольку во всех вышеперечисленных случаях мутантные формы ТТ нарабатывали в *E. coli*, не способной осуществлять процессинг синтезируемого полипептида, для получения зрелого анатоксина очищенный продукт расщепляли трипсином (табл. 2).

Гетерологичная экспрессия полноразмерного столбнячного анатоксина представляет собой довольно сложную задачу. Помимо необходимости обеспечить правильный фолдинг и процессинг белка, множество усилий было направлено на получение генетически инактивированного ТТ. В 2021 г. компанией «Fina Biosolutions» (США) была подана патентная заявка WO 2021188379 A2 [80] на получение нетоксичного варианта столбнячного токсина 8MTT, который до этого был протестирован в качестве носителя в гликоконъюгате с капсульными полисахаридами *H. influenzae* типа b и показал сходную со столбнячным анатоксином эффективность [79]. Таким образом, можно надеяться, что после прохождения всех необходимых клинических испытаний на рынке появятся вакцины с использованием в качестве носителя генетически инактивированного столбнячного токсина.

Таблица 2. Получение рекомбинантного столбнячного токсина

Рекомбинантный белок	Продуцент	Плазмида/ промотор	Способ получения двухсубъединичной формы	Растворимость/ продуктивность	Модули для аффинной очистки	Ссылка
Природная и мутантная (H233A, E234A, H237A) формы LC	<i>Escherichia coli</i> JM109	производная pMAL-c2/Tac	реконструкция из отдельно экспрес- сированных LC фрагментов и HC, полученной расщеплением природного токсина	растворимые	мальтоза- связывающий белок MBP	[74]
LC и HC	<i>E. coli</i> JM109	производная pMAL-c2/Tac	реконструкция из отдельно экспрес- сированных фрагментов LC и HC	растворимые	мальтоза- связывающий белок MBP	[75]
Слитный белок из фрагментов LC и HC, разделённых линкером с сайтом энтерокиназы, природная и мутантная (E234A) формы	<i>E. coli</i> JM109	производная pTrcHisA/Lac	расщепление слитного белка энтерокиназой	растворимый/ 9 мг/литр	His6	[76]
Полноразмерный мутантный (R372A и Y375F) белок	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a/T7	расщепление очищенного продукта трипсином	растворимый/ 2–8 мг/литр	His6 и три FLAG эпитопа — на N-конце, эпитопы HA и Strep — на C-конце	[77]
Полноразмерный мутантный (Y26A, L230K, E234Q, R372A, Y375F, K768A, R1226L, W1289A) белок (8MTT)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a/T7	расщепление очищенного продукта трипсином	растворимый/ 5 мг очищенного белка на 1 литр культуры	His6	[78]
Полноразмерный мутантный (Y26A, L230K, E234Q, R372A, Y375F, K768A, R1226L, W1289A) белок (8MTT)	<i>E. coli</i> Gor/Met TM	производная pET24/Tac	расщепление очищенного продукта трипсином	растворимый/ 1 г/литр культуры (ферментёр)	нет	[79]

Примечание. LC — каталитически активная лёгкая цепь столбнячного токсина из анаэробных бактерий *Clostridium tetani*; HC — тяжёлая цепь столбнячного токсина из анаэробных бактерий *Clostridium tetani*.

БЕЛОК D БАКТЕРИИ *Haemophilus influenzae*

Белок D — высококонсервативный поверхностный липопротеин бактерии *H. influenzae*, расположенный на внешней мембране как инкапсулированных, так и лишённых капсулы (а значит, нетипируемых) штаммов. Природный белок несёт на N-конце консенсусную последовательность, узнаваемую сигнальной пептидазой II, которая отщепляет указанный пептид с образованием процессированного

продукта размером 42 кДа [81]. Последовательность гена и ферментативная активность белка имеют значительное сходство с таковыми у гликофосфодиэстеразы GlpQ из *E. coli* [82]. Несмотря на общую гидрофильность молекулы и отсутствие выраженных гидрофобных мотивов, белок D является мембранным. Заякоривание в мембране происходит путём присоединения жирных кислот к остатку цистеина-19. При удалении данного аминокислотного остатка молекула становится

Таблица 3. Получение рекомбинантного белка D

Рекомбинантный белок	Продуцент	Плазмида/промотор	Локализация	Ссылка
Природный PD	<i>Escherichia coli</i> JM83	pUC18/эндогенный промотор	внешняя мембрана	[81]
PD (C19G)	<i>E. coli</i> JM83	pUC18/эндогенный промотор	периплазма	[83]
PD (C19G)	<i>E. coli</i> JM83	pUC19	периплазма	[84]
усечённый PD (а.о. 192–299)	<i>E. coli</i> TOP10	pBAD/ <i>araBAD</i>	периплазма	[85]

полностью гидрофильной и секретируется в периплазматическое пространство [83]. Свойства PD, такие как поверхностная локализация, высокая степень консервативности и широкая распространённость у разных штаммов, делают его хорошим кандидатом на роль носителя для конъюгированных вакцин.

В геноме *H. influenzae* ген белка D (*hpd*) находится под контролем слабого промотора. При гетерологичной экспрессии природного PD в *E. coli* было отмечено, что усиление экспрессии, вызванное tandemным расположением эндогенного промотора и *lac*-промотора плазмиды pUC18, приводит к угнетению роста и автолизу клеток, что свидетельствует о токсическом эффекте высокой концентрации белка D [81]. Рекомбинантный природный PD локализован на поверхности клеток *E. coli*, в то время как мутантная неацилированная форма PD, получаемая при замене C19G, присутствует преимущественно в периплазматической фракции [83]. Перенос экспрессионной кассеты в плазмиду pUC19 позволил на порядок повысить уровень синтеза неацилированного PD, при этом эффектов его токсического воздействия на клетки не было обнаружено, а периплазма содержала преимущественно рекомбинантный белок [84]. Анализ иммуногенных эпитопов PD из различных штаммов *H. influenzae* позволил выбрать высококонсервативный участок PD (а.о. 192–299) в качестве кандидатного антигена для производства вакцин. Усечённый ген клонировали в плазмиду pBAD под контролем сильного промотора *araBAD*, что позволило повысить выход целевого белка до 4 мг/литр культуры [85] (табл. 3).

Исследования показали, что несмотря на некоторое снижение иммунного ответа на растворимую форму PD по сравнению с ацилированной, его достаточно для достижения протективного эффекта [84, 86], поэтому именно неацилированная форма используется при производстве конъюгированных вакцин, например Synflorix от «GlaxoSmithKline» (Велико-

британия) [87]. Вакцина, в состав которой входят капсульные полисахариды стрептококка и белок D, показала высокую эффективность против обоих возбудителей, значительно снижая количество острых отитов, вызванных не-типизируемыми штаммами *H. influenzae* [88–90].

КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ (ОМРС), ВЕЗИКУЛЫ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ (ОМV) И МОДУЛИ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ (GMMA)

Процесс роста грамотрицательных бактерий часто сопровождается высвобождением небольших (25–200 нм) везикул, получивших общее название ОМV. Присутствие в их составе множества бактериальных антигенов, таких как липополисахариды и мембранные белки, а также размер и гидрофобность делают их сильными иммуногенами и привлекательным объектом для использования в производстве вакцинных препаратов [15].

Везикулы, содержащие комплексы белков внешней мембраны *N. meningitidis* серогруппы В, используют как в качестве сырья для производства противоменингококковых вакцин, так и в качестве носителей в составе Hib-конъюгатов. Данные препараты демонстрируют большую иммуногенность по сравнению с Hib-конъюгатами на основе дифтерийного и столбнячного анатоксинов и CRM197, причём разница особенно заметна при первичной иммунизации [91, 92]. Стимулирующий эффект предположительно достигается не столько активацией В-клеток входящими в состав везикул липополисахаридами, сколько митогенным воздействием на лимфоциты поринов PorA2 и других мембранных белков [93, 94].

Большинство природных штаммов высвобождает небольшое количество везикул, поэтому для производства ОМРС используют метод экстракции мембранных комплексов из биомассы с помощью детергентов. Эти везикулы,

Таблица 4. Получение рекомбинантных OMV

Организм/Штамм	Внесённые изменения	Эффект	Ссылка
<i>Escherichia coli</i> IHE3034	делеция <i>tolR</i>	сверхпродукция везикул	[101]
<i>Neisseria meningitidis</i> H44/76	делеции <i>rmpM</i> , <i>lpxL1</i> , <i>porB</i> ; усечённый <i>galE</i> ; три варианта гена белка PorA	сверхпродукция везикул, снижение токсичности, расширение спектра антигенов	[102]
<i>N. meningitidis</i> 8570	делеции <i>lpxL1</i> , <i>synX</i> ; усиление экспрессии белков fHbp и OpcA; дополнительный вариант PorA	снижение токсичности, нарушение формирования капсулы, расширение спектра антигенов, усиление иммуногенности	[103]
<i>Shigella sonnei</i> 53G	делеции <i>tolR</i> , <i>galU</i> , <i>msbB1</i>	сверхпродукция везикул, снижение токсичности	[104]
<i>Sh. sonnei</i> 53G, <i>Shigella flexneri</i> 2a 2457T	делеции <i>msbB1</i> , <i>htrB</i> , <i>rfaG</i>	снижение токсичности	[100]
<i>N. meningitidis</i> 1630	делеции <i>synX</i> , <i>ctrA</i> , <i>pxL1</i> , <i>gna33</i> оверэкспрессия белка fHbp	сверхпродукция везикул, нарушение формирования капсулы, снижение токсичности, усиление иммуногенности	[105]
<i>Sh. sonnei</i> 53G	хромосомные делеции <i>tolR</i> , <i>htrB</i> , замена в вирулентной плазмиде pSS гена <i>virG</i> на <i>nadAB</i>	сверхпродукция везикул, снижение токсичности, усиление иммуногенности	[99]
<i>Salmonella enterica</i> серovar Typhimurium изолят 1418	делеции <i>tolR</i> , <i>msbB</i> , <i>pagP</i>	сверхпродукция везикул, снижение токсичности	[106]

наряду с хорошо известными мембранными белками, такими как порины PorA и PorB, RmpM (reduction modifiable protein) и инвазин OpcA [95, 96], содержат различные периплазматические и цитоплазматические белки, а также белки внутренней мембраны, которые могут составлять до 60% от общего содержания белков [17, 95, 97]. В то же время OMV, полученные из штаммов, склонных к спонтанному высвобождению везикул, содержат преимущественно белки внешней мембраны, и присутствие «мусорных» белков в них незначительно. Было продемонстрировано, что введение мышам препарата на основе везикул, полученных из штамма *N. meningitidis* серогруппы В с мутацией $\Delta gna33$, провоцирующей усиленное везикулообразование, вызывало образование антител с бактерицидной активностью и обеспечивало больший протективный эффект против более широкой панели штаммов, чем везикулы из клеток дикого типа [98]. Также было отмечено, что использование дезоксихолата натрия или других детергентов приводит к потере слабоассоциированных мембранных липопротеинов, которые важны для образования нейтрализующих антител [14].

Данные наблюдения положили начало разработке генноинженерных штаммов, отличающихся высокой частотой формирования везикул. Дальнейшие усилия были сосредоточены в двух направлениях: уменьшение токсичности везикул и повышение их иммуногенности за счёт увеличения количества и разнообразия экспонированных мембранных белков (табл. 4). Уменьшение токсичности спонтанно высвобождаемых везикул крайне важно для начала клинических исследований на людях, поскольку при производстве ОМРС большая часть эндотоксинов инактивировалась используемыми при экстракции детергентами. Делеции генов, вовлечённых в ацилирование мембранного липида А, позволяют получать везикулы с пентаацилированными производными, которые, в отличие от гексаацилированных форм, обладают меньшей токсичностью и позволяют снизить выраженность и число побочных эффектов в сотни и даже десятки тысяч раз в зависимости от метода оценки [15, 99, 100]. Повышение иммуногенности достигается как за счёт суперэкспрессии отдельных поверхностных белков, так и за счёт помещения в геном различных вариантов

их генов, что позволяет обеспечить иммунный ответ против большего спектра штаммов возбудителя. Такие везикулы получили название GMMA.

Антигенный спектр на поверхности везикул можно дополнительно расширить путём трансформации штаммов-продуцентов плазмидами, несущими слитные гены белков, содержащих целевые эпитопы. Для этих целей часто используют систему на основе трансмембранного белка цитоллизина A (ClyA), слитые с С-концом которого эпитопы экспонируются на поверхности везикулы. Таким образом, были получены OMV модифицированного штамма *E. coli* с экспонированным GFP [107], эпитопом белка M2 вируса гриппа [108] и последовательностью узнавания рецептора HER2 для создания противоопухолевых вакцин [109]. С той же целью разработаны системы на основе модифицированной протеазы (Hbp), с помощью которых удалось получить OMV, несущие антигены *Mycobacterium tuberculosis* и *Chlamydia trachomatis* [110], а также других возбудителей инфекционных заболеваний [111].

Полученные рекомбинантные везикулы используют для создания конъюгированных вакцин как с белковыми [112–114], так и с полисахаридными [112, 115] антигенами. Так, в работе Micoli et al. [112] GMMA, полученные из *ΔtolR* мутантного штамма *S. enterica* серовар Typhimurium, использовали для получения Hib-конъюгатов и конъюгатов с олигосахаридами *N. meningitidis* серогрупп А и С (MenA и MenC). Иммунизация животных полученными препаратами привела к более высокому титру антител по сравнению с аналогичными конъюгатами на основе CRM197. Подобные GMMA, дополнительно дефектные по О-антигенам, использовали для получения конъюгатов с углеводами группы А клеточной стенки стрептококков (GAC) [115]. Полученный препарат обладает сходной иммуногенностью по отношению к конъюгату на основе CRM197, однако экономически более выгоден благодаря повышенной продуктивности. Исследование конъюгатов GMMA, полученных из модифицированных штаммов *S. enterica* серовар Typhimurium и *N. meningitidis*, с полноразмерными и расщеплёнными углеводами Hib, MenA, MenC, Vi и GAC показало, что иммунный ответ на полисахариды не зависит от их молярного соотношения с GMMA, однако избыток полисахаридных цепей ухудшает антигенные свойства носителя. В то же время оптимальная длина конъюгируемых антигенов и сила Т-опосредованного гуморального иммунного ответа строго зависят от природы полисахаридов [116].

ДРУГИЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Как уже было упомянуто выше, эффективность конъюгированных вакцин при иммунизации препаратами, содержащими одинаковые белки-носители и разные полисахариды, меняется непредсказуемым образом. Кроме того, расширение спектра белков-носителей позволяет получать большее разнообразие защитных антител, в том числе против новых патогенов. Поэтому исследования новых белков, отвечающих требованиям к белкам-носителям, и разработка систем их экспрессии ведутся крайне активно. И хотя клинические испытания большинства прототипов новых вакцин ещё не проводились либо находятся на ранних стадиях, полученные на животных моделях данные позволяют надеяться, что появление новых препаратов на рынке — дело времени.

«Нетрадиционные» носители используют как для создания моновалентных вакцин, когда антигены и носитель принадлежат одному организму (например, конъюгаты мутантного варианта экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА) с полисахаридами того же организма), или гетеровалентных, когда носитель конъюгируют с антигенами других патогенов (например, конъюгаты ЕРА с О-антигенами *Shigella*, капсулярными полисахаридами *Staphylococcus aureus*, Vi-антигеном *S. enterica* серовар Typhi) [8, 16, 19].

Получение новых рекомбинантных белков для использования в конъюгированных вакцинах можно свести к закономерностям, подробно описанным выше для CRM197, TT и белка D. Для снижения стоимости культивирования и требований к биологической безопасности гетерологичную экспрессию стараются осуществлять в широко распространённых продуцентах, таких как штаммы *E. coli* либо дрожжи.

Токсичные белки часто рассматривают в качестве носителей благодаря их высокой иммуногенности. Чтобы избежать процедуры химической инактивации, их токсичность снижают с помощью получения мутантных нетоксичных форм (табл. 5). Так, из экзотоксина А *P. aeruginosa* путём одной замены (E553C) или делеции (ΔE553) в каталитическом домене получали нетоксичный мутантный вариант, названный ExoProtein A (ЕРА), получивший особенно широкое распространение при создании биоконъюгированных вакцин. Второй вариант снижения токсичности — использование фрагментов белков, сохранивших часть антигенных эпитопов, но лишённых отвечающего

Таблица 5. Получение рекомбинантных белков-носителей

Белок/организм	Продуцент	Плазмида	Ссылка
EPA (ΔE553) — нетоксичный мутант экзотоксина A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> JM103	pCDptac2	[118]
EPA (E553C)	<i>E. coli</i> JM103	pBR322	[119]
EPA (ΔE553)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET-24a	[120]
rARU — усечённый вариант токсина A <i>Clostridium difficile</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pRSET	[117]
Белки пилей <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET24b	[121]
Усечённый шиповидный белок ротавируса ΔVP8*	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a	[122]
PspA — фрагмент поверхностного белка A <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET37b+	[123]
PhtD и PhtE — адгезины <i>Str. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pDUMP	[124]
Слитные белки, несущие эпитопы Ply, PspA и PsaA <i>Str. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pGEX-6p-3	[125]
SLO(ΔC101) (79–470) — фрагмент стрептолизина O стрептококков группы A	бесклеточная система синтеза Xpress cell-free protein synthesis (CFPS)	проприетарный	[126]
HBsAg — поверхностный антиген гепатита B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen	pRMHP1.0	[127]
Pfs25 из <i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Pichia pastoris</i>	pPICZA	[128]

за токсичность каталитического домена, что аналогично использованию C-фрагмента столбнячного токсина. В качестве примера можно привести усечённую форму токсина A *Clostridium difficile* (rARU) [117]. Другими сильными иммуногенами являются поверхностные белки бактерий, в том числе белки пилей и порины.

Использование новых носителей позволяет не только снизить вероятность иммунной интерференции и усилить иммунный ответ на слабый антиген по сравнению с конъюгатами на основе «традиционных» носителей, но и получить антитела, обладающие новыми свойствами. Например, использование гетерологично экспрессированного в *E. coli* менингококкового порина rPorB [94] в составе Hib-конъюгата приводило к индукции у крыс на два порядка более высокого титра антител после второго введения вакцины по сравнению с конъюгатом на основе столбнячного анатоксина [95]. Моновалентная вакцина конъюгата rPorB с полисиаловой кислотой капсулы менингококков группы B в экспериментах на животных вызывала образование высокого титра антител, обладающих прямой

бактерицидной активностью, а контрольный конъюгат на основе столбнячного анатоксина давал меньший титр антител к полисахариду и не давал антител с антибактериальной активностью [96].

В последнее время большое внимание уделяется использованию в качестве носителей вирусоподобных частиц (VLP) и нанокapsул из невирусных белков, иммунные свойства которых во многом аналогичны OMV. Эти носители в большей мере используются для конъюгации с белками и пептидами. Однако можно привести примеры конъюгации VLP с полисахаридами и олигосахаридами, которые являются антигенами как возбудителей заболеваний [129, 130], так и опухолевых клеток, поскольку для поверхности клеток, подвергшихся злокачественному перерождению, характерно присутствие данных антигенов в количествах, значительно превышающих таковые у здоровых клеток [131, 132]. Гетерологичную экспрессию VLP в основном осуществляют в *E. coli* [131, 133–135] и бакуловирусных системах [129, 136], аналогично другим рекомбинантным белкам.

БИОКОНЬЮГИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ

Главной целью создания метода биоконъюгации PGCT (Protein Glycan Coupling Technology) было получение продуцентов, в которых оба компонента гликоконъюгата синтезируются внутри одной клетки-хозяина, а присоединение углеводной составляющей к белку-носителю осуществляется с помощью клеточной машинерии, что должно значительно облегчить и удешевить процесс получения вакцин.

В процессе получения биоконъюгатов можно выделить три этапа. На первом этапе клетки продуцента, в качестве которого чаще всего выступает *E. coli*, трансфицируют плазмидой, несущей локус, гены которого обеспечивают синтез целевого гликана, закрепляемого на мембране с помощью липидного якоря. На втором этапе клетки, экспрессирующие эпитопы, узнаваемые антителами против целевого гликана, трансфицируют плазмидой, экспрессирующей белок-носитель, в последовательность которого добавлен участок узнавания олигосахарилтрансферазы. Наконец, клетки-продуценты трансфицируют плазмидой, экспрессирующей ген олигосахарилтрансферазы, узнающей заякоренный на мембране гликан и переносимой углеводную цепь на специфическую последовательность белка-носителя. В качестве олигосахарилтрансферазы чаще всего используют белок PglB из бактерии *Campylobacter jejuni*, а в качестве белка-носителя в подавляющем большинстве случаев выступает экзопротеин А *P. aeruginosa* — ЕРА. Углеводная часть может быть представлена как О-антигенами, так и компонентами клеточной стенки болезнетворных микроорганизмов [19, 20, 137]. Модификация данного метода позволяет получать биоконъюгаты на основе ОМV, для чего достаточно поместить в продуцирующий везикулы штамм *E. coli* локус биосинтеза целевого гликана.

В настоящее время известно как минимум о двух биоконъюгатных вакцинах, находящихся на второй стадии клинических испытаний: Flexyn2a против *Shigella flexneri* [138] и ExPEC4V против патогенной внекишечной *E. coli* [139]. Ещё большее количество биоконъюгатов находятся на более ранних этапах испытаний или в стадии разработки [19, 20, 137].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из важных требований к белкам и их производным, которые предполагается

использовать в качестве носителей в составе конъюгированных вакцин, является возможность наработывать целевые белки в больших количествах, причём процесс производства должен быть максимально воспроизводим и экономически обоснован. Гетерологичная экспрессия позволяет снизить издержки производства белков несколькими путями. Во-первых, выход продукта можно повысить путём оптимизации последовательности гена целевого белка, использования сильных промоторов, более эффективных лидерных последовательностей и других вспомогательных генетических элементов. Снижение стоимости производства также возможно за счёт большей унификации при использовании в качестве продуцентов распространённых малопатогенных организмов, культивирование которых не представляет сложностей с точки зрения требований к безопасности, доступности сред и наличия большого опыта по оптимизации протоколов выращивания. Поскольку в подавляющем большинстве случаев в качестве носителей в конъюгированных вакцинах используют бактериальные (реже вирусные) белки, не требующие сложных посттрансляционных модификаций в виде определённого паттерна гликозилирования, гетерологичную экспрессию этих белков чаще всего осуществляют в самом распространённом лабораторном продуценте бактериальных белков — *E. coli*. К его достоинствам, помимо упомянутых выше, также относится наличие широкого спектра коммерчески доступных штаммов, свойства которых позволяют осуществлять суперэкспрессию с сильных гетерологичных промоторов, а также получать белки, фолдинг которых требует специальных условий. Кроме того, среди имеющихся штаммов *E. coli* есть продуценты с пониженным содержанием эндотоксинов (ClearColi), что также существенно облегчает процедуру очистки целевого белка. Коэкспрессия нескольких гетерологичных генов также позволяет удешевить производство, как например, в случае биоконъюгированных вакцин или GMMA, одновременно несущих белки нескольких патогенных организмов или их штаммов.

На примере «традиционных» носителей можно ознакомиться со способами преодоления широкого спектра проблем, возникающих в процессе гетерологичной экспрессии. Например, в случае изначально секретируемого белка CRM197 не удалось разработать гетерологичную систему, осуществляющую секрецию целевого продукта в культивационную среду, однако наработка CRM197 в периплазме

и цитоплазме также может оказаться оправданной с точки зрения производства. В случае цитоплазматической экспрессии проблему правильного формирования дисульфидных связей удалось преодолеть с помощью использования продуцентов с изменённым окислительно-восстановительным потенциалом цитоплазмы и/или дополнительной экспрессией шаперонов. В случае ТТ, помимо проблемы получения нетоксичной формы, дополнительной трудностью являлась необходимость посттрансляционного расщепления белка-предшественника. В настоящее время данную операцию осуществляют с помощью обработки очищенного белка трипсином, но можно предположить, что дальнейшим направлением работы может быть создание штамма *E. coli*, способного осуществлять требуемый тип посттрансляционной модификации. В случае белка D удобство производства его неацилированной формы перевесило минусы в виде некоторого снижения его иммунных свойств, поскольку было показано, что использование модифицированного белка также обеспечивает необходимый протективный эффект. Для получения модифицированных OMV чаще всего недостаточно ограничиться экспрессией с плазмид дополнительных белков, расширяющих антигенное разнообразие на поверхности везикул. Для получения эффективного продуцента необходимо вмешательство в геном, позволяющее снизить токсичность входящих в состав везикул липополисахаридов, а также повысить частоту спонтанного образования везикул. Специально разработанные штаммы *E. coli*, способные к сверхпродукции везикул, потенциально могут прийти на смену модифицированным штаммам патогенов, что позволит снизить класс биологической опасности при производстве OMV.

Использование новых белков-носителей призвано как повысить эффективность уже имеющихся вакцин, так и расширить спектр поддающихся вакцинопрофилактике заболеваний. Тем не менее вывод на рынок новых

вакцин — крайне длительный процесс. В данный момент входящие в состав вакцинных препаратов рекомбинантные белки представлены только CRM197 и неацилированным белком D. В качестве примера длинного пути от разработки к производству можно привести историю появления на рынке препаратов на основе везикул грамотрицательных бактерий. Первые неконъюгированные вакцины с использованием OMV были одобрены к применению в конце 1980-х гг. Однако вакцины на основе модифицированных штаммов, содержащих OMV с несколькими видами поринов (MonoMen®, HexaMen®, NonaMen®; Netherlands Vaccine Institute) не одобрены до сих пор, хотя и показали свою эффективность в исследованиях на животных [140]. Вакцина Bexsero («GlaxoSmithKline»), содержащая OMV с несколькими рекомбинантными белками, была одобрена в 2013 г. после двадцатилетней разработки [141]. Вакцины на основе GMMa пока ещё находятся на стадии разработки [142] и, скорее всего, ожидать их появления на рынке можно в течение двух ближайших десятилетий. Возможно, что сокращению сроков лицензирования вакцин будет способствовать опыт ускоренного проведения клинических исследований и вывода на рынок противокоронавирусных вакцин во время пандемии COVID-19. Можно предположить, что со временем разнообразие рекомбинантных белков в составе вакцин будет увеличиваться, что, в свою очередь, приведёт к разработке новых систем их гетерологичной экспрессии и новым оригинальным решениям в преодолении сложностей, возникающих в этом процессе.

Благодарности. И.И. Воробьёву, А.Ю. Рязановой (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья является обзором, написанным по результатам статей, соблюдение этических норм в каждой из которых указано в их тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weller, P. F., Smith, A. L., Smith, D. H., and Anderson, P. (1978) Role of immunity in the clearance of bacteremia due to *Haemophilus influenzae*, *J. Infect. Diseases*, **138**, 427-436, doi: 10.1093/infdis/138.4.427.
2. Finlay, B. B., and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 136-169, doi: 10.1128/mmbr.61.2.136-169.1997.
3. Kasper, D. L. (1986) Bacterial capsule — old dogmas and new tricks, *J. Infect. Diseases*, **153**, 407-415, doi: 10.1093/infdis/153.3.407.
4. Zimmermann, S., and Lepenies, B. (2015) Glycans as vaccine antigens and adjuvants: immunological

- considerations, *Methods Mol. Biol.*, **1331**, 11-26, doi: 10.1007/978-1-4939-2874-3_2.
5. Hütter, J., and Lepenies, B. (2015) Carbohydrate-based vaccines: an overview, *Methods Mol. Biol.*, **1331**, 1-10, doi: 10.1007/978-1-4939-2874-3_1.
 6. MacCalman, T. E., Phillips-Jones, M. K., and Harding, S. E. (2019) Glycoconjugate vaccines: some observations on carrier and production methods, *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.*, **35**, 93-125, doi: 10.1080/02648725.2019.1703614.
 7. Avci, F. Y., and Kasper, D. L. (2010) How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system, *Annu. Rev. Immunol.*, **28**, 107-130, doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101159.
 8. Micoli, F., Adamo, R., and Costantino, P. (2018) Protein carriers for glycoconjugate vaccines: history, selection criteria, characterization and new trends, *Molecules*, **23**, 1451, doi: 10.3390/molecules23061451.
 9. Möller, J., Kraner, M. E., and Burkovski, A. (2019) More than a toxin: protein inventory of clostridium tetani toxoid vaccines, *Proteomes*, **7**, 15, doi: 10.3390/proteomes7020015.
 10. Bayart, C., Mularoni, A., Hemmani, N., Kerachni, S., Jose, J., Gouet, P., Paladino, J., and Le Borgne, M. (2022) Tetanus toxin fragment C: structure, drug discovery research and production, *Pharmaceuticals*, **15**, 756, doi: 10.3390/ph15060756.
 11. Bröker, M., Costantino, P., DeTora, L., McIntosh, E. D., and Rappuoli, R. (2011) 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*, **39**, 195-204, doi: 10.1016/j.biologicals.2011.05.004.
 12. Shinefield, H. R. (2010) Overview of the development and current use of CRM(197) conjugate vaccines for pediatric use, *Vaccine*, **28**, 4335-4339, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.072.
 13. Forsgren, A., Riesbeck, K., and Janson, H. (2008) Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable *H. influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines, *Clin. Infect. Dis.*, **46**, 726-731, doi: 10.1086/527396.
 14. Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J., and Rosenqvist, E. (2009) Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*, *Vaccine*, **27 Suppl 2**, B3-B12, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071.
 15. Rossi, O., Citiulo, F., and Mancini, F. (2021) Outer membrane vesicles: moving within the intricate labyrinth of assays that can predict risks of reactogenicity in humans, *Human Vaccines Immunother.*, **17**, 601-613, doi: 10.1080/21645515.2020.1780092.
 16. Bröker, M., Berti, F., Schneider, J., and Vojtek, I. (2017) Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a “neglected valency” – potential and limitations, *Vaccine*, **35**, 3286-3294, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.04.078.
 17. Dagan, R., Poolman, J., and Siegrist, C. A. (2010) Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review, *Vaccine*, **28**, 5513-5523, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.026.
 18. Pichichero, M. E. (2013) Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials, *Human Vaccines Immunother.*, **9**, 2505-2523, doi: 10.4161/hv.26109.
 19. Van der Put, R. M. F., Metz, B., and Pieters, R. J. (2023) Carriers and antigens: new developments in glycoconjugate vaccines, *Vaccines*, **11**, 219, doi: 10.3390/vaccines11020219.
 20. Kay, E., Cuccui, J., and Wren, B. W. (2019) Recent advances in the production of recombinant glycoconjugate vaccines, *NPJ Vaccines*, **4**, 16, doi: 10.1038/s41541-019-0110-z.
 21. Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J., and Eisenberg, D. (1992) The crystal structure of diphtheria toxin, *Nature*, **357**, 216-222, doi: 10.1038/357216a0.
 22. Rappuoli, R. (1990) *New and Improved Vaccines against Diphtheria and Tetanus*, 2nd Edn., Marcel Dekker, New York.
 23. Brodzik, R., Spitsin, S., Pogrebnyak, N., Bandurska, K., Portocarrero, C., Andryszak, K., Koprowski, H., and Golovkin, M. (2009) Generation of plant-derived recombinant DTP subunit vaccine, *Vaccine*, **27**, 3730-3734, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.084.
 24. Greenfield, L., Bjorn, M. J., Horn, G., Fong, D., Buck, G. A., Collier, R. J., and Kaplan, D. A. (1983) Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6853-6857, doi: 10.1073/pnas.80.22.6853.
 25. Malito, E., Bursulaya, B., Chen, C., Lo Surdo, P., Picchianti, M., Balducci, E., Biancucci, M., Brock, A., Berti, F., Bottomley, M. J., Nisum, M., Costantino, P., Rappuoli, R., and Spraggon, G. (2012) Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 5229-5234, doi: 10.1073/pnas.1201964109.
 26. Ratti, G., Rappuoli, R., and Giannini, G. (1983) The complete nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxin in the corynebacteriophage omega (tox+) genome, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6589-6595, doi: 10.1093/nar/11.19.6589.
 27. Uchida, T., Pappenheimer, A. M., Jr., and Greany, R. (1973) Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3838-3844, doi: 10.1016/S0021-9258(19)43810-6.
 28. Hu, V. W., and Holmes, R. K. (1987) Single mutation in the A domain of diphtheria toxin results in a protein with altered membrane insertion behavior,

- Biochim. Biophys. Acta*, **902**, 24-30, doi: 10.1016/0005-2736(87)90132-5.
29. Khatuntseva, E. A., and Nifantiev, N. E. (2022) Cross reacting material (CRM197) as a carrier protein for carbohydrate conjugate vaccines targeted at bacterial and fungal pathogens, *Int. J. Biol. Macromol.*, **218**, 775-798, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.137.
 30. Sundaran, B., Rao, Y. U., and Boopathy, R. (2001) Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation, *J. Biosci. Bioengin.*, **91**, 123-128, doi: 10.1263/jbb.91.123.
 31. Suwanpatcharakul, M., Pakdeechaoen, C., Visuttitewin, S., Pesirikan, N., Chauvatcharin, S., and Pongtharangkul, T. (2016) Process optimization for an industrial-scale production of Diphtheria toxin by *Corynebacterium diphtheriae* PW8, *Biologicals*, **44**, 534-539, doi: 10.1016/j.biologicals.2016.08.002.
 32. Tchorbanov, A. I., Dimitrov, J. D., and Vassilev, T. L. (2004) Optimization of casein-based semisynthetic medium for growing of toxigenic *Corinebacterium diphtheriae* in a fermenter, *Can. J. Microbiol.*, **50**, 821-826, doi: 10.1139/w04-061.
 33. Rappuoli, R., Perugini, M., Marsili, I., and Fabbiani, S. (1983) Rapid purification of diphtheria toxin by phenyl sepharose and DEAE-cellulose chromatography, *J. Chromatogr.*, **268**, 543-548, doi: 10.1016/S0021-9673(01)95457-3.
 34. Zhou, J., and Petracca, R. (1999) Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in *B. subtilis*, *J. Tongji Med. Univ.*, **19**, 253-256, doi: 10.1007/bf02886955.
 35. Orr, N., Galen, J. E., and Levine, M. M. (1999) Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM(197), and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA, *Infect. Immun.*, **67**, 4290-4294, doi: 10.1128/iai.67.8.4290-4294.1999.
 36. Stefan, A., Conti, M., Rubboli, D., Ravagli, L., Presta, E., and Hochkoepler, A. (2011) Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **156**, 245-252, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.08.024.
 37. Mahamad, P., Boonchird, C., and Panbangred, W. (2016) High level accumulation of soluble diphtheria toxin mutant (CRM197) with co-expression of chaperones in recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 6319-6330, doi: 10.1007/s00253-016-7453-4.
 38. Xu, L., Zhang, J., Yu, R., and Su, Z. (2017) Expression of CRM197 in *E. coli* system and its application in universal influenza vaccine, *Chin. J. Process Eng.*, **17**, 1054-1058.
 39. Goffin, P., Dewerchin, M., De Rop, P., Blais, N., and Dehottay, P. (2017) High-yield production of recombinant CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin, in the periplasm of *Escherichia coli*, *Biotechnol. J.*, **12**, 1700168, doi: 10.1002/biot.201700168.
 40. Roth, R., van Zyl, P., Tsekoa, T., Stoychev, S., Mamputha, S., Buthelezi, S., and Crampton, M. (2017) Co-expression of sulphhydryl oxidase and protein disulphide isomerase in *Escherichia coli* allows for production of soluble CRM(197), *J. Appl. Microbiol.*, **122**, 1402-1411, doi: 10.1111/jam.13441.
 41. Mishra, R. P. N., Yadav, R. S. P., Jones, C., Nocadello, S., Minasov, G., Shuvalova, L. A., Anderson, W. F., and Goel, A. (2018) Structural and immunological characterization of *E. coli* derived recombinant CRM(197) protein used as carrier in conjugate vaccines, *Biosci. Rep.*, **38**, BSR20180238, doi: 10.1042/bsr20180238.
 42. Park, A. R., Jang, S. W., Kim, J. S., Park, Y. G., Koo, B. S., and Lee, H. C. (2018) Efficient recovery of recombinant CRM197 expressed as inclusion bodies in *E. coli*, *PLoS One*, **13**, e0201060, doi: 10.1371/journal.pone.0201060.
 43. Fang, T., Tao, Z., Liu, Y., Yu, C., Zhi, R., and Yu, R. (2018) Expression, purification and characterization of diphtheria toxin mutant CRM197 in *Escherichia coli*, *Chinese J. Biotechnol.*, **34**, 561-568, doi: 10.13345/j.cjb.170333.
 44. Chai, P., Pu, X., Ge, J., Ren, S., Xia, X., Luo, A., Wang, S., Wang, X., and Li, J. (2021) The recombinant protein combined vaccine based on the fragment C of tetanus toxin and the cross-reacting material 197, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 1683-1692, doi: 10.1007/s00253-021-11139-8.
 45. Khodak, Y. A., Ryazanova, A. Y., Vorobiev, I. I., Kovalchuk, A. L., Ovechko, N. N., and Aparin, P. G. (2023) High-level production of soluble cross-reacting material 197 in *Escherichia coli* cytoplasm due to fine tuning of the target gene's mRNA structure, *Biotech*, **12**, 9, doi: 10.3390/biotech12010009.
 46. Retallack, D.M., Chew, L., Jin, H. (2010) *High Level Expression of Recombinant CRM197*. Patent No. WO 2011/123139 A1.
 47. Духовлинов И. В., Богомолова Е. Г., Добровольская О. А., Ищук С. А., Федорова Е. А., Климов Н. А., Симбирцев А. С. (2018) Изучение продукции нетоксичного варианта дифтерийного токсина CRM197 в клетках *Escherichia coli*, *Медицинский академический журнал*, **18**, 64-70.
 48. Духовлинов И. В., Федорова Е. А., Богомолова Е. Г., Добровольская О. А., Черняева Е. Н., Аль-Шехадат Р. И., Симбирцев А. С. (2015) Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli*, *Инфекция и иммунитет*, **5**, 37-44.
 49. Baglioni, P., Hochkoepler, A., and Stefan, A. (2010) *Bacterial expression of an artificial gene for the production of CRM197 and its derivatives*. Patent No. WO 2010/150230 A1.
 50. Lee, H. C., Koo, B. S., Seo, H. J., Kim, J. S., Park, A. R., and Jang, S. W. (2019) *Method for Efficiently Recovering and Purifying Active CRM197 from*

- Insoluble CRM197 Protein Expressed in Inclusion Body*. Patent No. WO 2019/151601 A1.
51. Akshay, G., Ravi, P. N. M., Narender, D. M., and Mahima, D. (2016) *Codon optimized polynucleotide for high level expression of CRM197*. Patent No. WO 2016/079755 A1.
 52. Moxiao, L., Xue, Z., Donghai, W., Yingxia, S., Junxian, G., Jingyi, W., and Qingmin, W. (2010) *Diphtheria Toxin Muton CRM197 and Its Preparation Process*. Patent No. CN 100999548 A.
 53. Jingyi, W., Lixia, S., Tongwen, X., Ting, D., Xue, Z., and Kebo, W. (2012) *Method for Purifying CRM197 Mutant*. Patent No. CN 101265288 B.
 54. Lin, F., Xiao, J., and Wei, W. (2013) *Preparation Method of Diphtheria Toxin Mutant CRM197*. Patent No. CN 103266125 A.
 55. Mao, H. (2018) *The Preparation Method of Diphtheria Toxin Muton CRM 197* Patent No. CN 104140972 B.
 56. Akshay, G., Tushar, J., Khrishnanad, T., Yogesh, M., Narender, D. M., and Mahima, D. (2017) *Industrially Scalable process for Recovering Biologically Active Recombinant Carrier Proteins*. Patent No. WO 2017/081700 A1.
 57. Blattner, C. R., Frisch, D. A., Novy, R. E., Henker, T. M., Steffen, E. A., Blattner, F. R., Choi, H., Posfai, G., and Landry, C. F. (2015) *Enhanced Production of Recombinant CRM197 in E. coli*. Patent No. WO 2015/134402 A1.
 58. Blais, N., Dehottay, P. M. H., Dewerchin, M., Goffin, P., and Martin, D. (2011) *Expression System*. Patent No. WO 2011/042516 A2.
 59. Ihssen, J., Kowarik, M., and Thony-Meyer, L.C. (2014) *Methods and Compositions Relating to CRM197*. Patent No. WO 2014/102265 A1.
 60. Hsu, Y., Sheu, S., Lei, B., and Wu, T. (2015) *Development of the Soluble Recombinant CRM197 Production by E. coli*. Patent No. US 2015/0184215 A1.
 61. Masson, L., Arbour, M., and Gauriat, M. (2019) *Systems and Methods for the Production of Diphtheria Toxin Polypeptides*. Patent No. WO 2019/035058 A1.
 62. Boock, J. T., Waraho-Zhmayev, D., Mizrach, D., and DeLisa, M. P. (2015) Beyond the cytoplasm of *Escherichia coli*: localizing recombinant proteins where you want them, *Methods Mol. Biol.*, **1258**, 79-97, doi: 10.1007/978-1-4939-2205-5_5.
 63. Graham, L. L., Beveridge, T. J., and Nanninga, N. (1991) Periplasmic space and the concept of the periplasm, *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 328-329, doi: 10.1016/0968-0004(91)90135-i.
 64. Oganessian, N., and Lees, A. (2015) *Expression and Purification of CRM197 and Related Proteins*. Patent No. WO 2015/117093 A1.
 65. Goretzki, K., and Habermann, E. (1985) Enzymatic hydrolysis of tetanus toxin by intrinsic and extrinsic proteases. Characterization of the fragments by monoclonal antibodies, *Med. Microbiol. Immunol.*, **174**, 139-150, doi: 10.1007/bf02298124.
 66. Bagetta, G., and Nisticò, G. (1994) Tetanus toxin as a neurobiological tool to study mechanisms of neuronal cell death in the mammalian brain, *Pharmacol. Ther.*, **62**, 29-39, doi: 10.1016/0163-7258(94)90003-5.
 67. Cohen, J. E., Wang, R., Shen, R. F., Wu, W. W., and Keller, J. E. (2017) Comparative pathogenomics of *Clostridium tetani*, *PLoS One*, **12**, e0182909, doi: 10.1371/journal.pone.0182909.
 68. Roper, M. H., Wassilak, S. G. F., Tiwari, T. S. P., and Orenstein, W. A. (2017) *Tetanus Toxoid*, 7th Edn., Elsevier, Philadelphia, PA, USA.
 69. Bayart, C., Peronin, S., Jean, E., Paladino, J., Talaga, P., and Borgne, M. L. (2017) The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures, *J. Chromatogr.*, **1054**, 80-92, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.04.009.
 70. Kaumaya, P. T., Kobs-Conrad, S., Seo, Y. H., Lee, H., VanBuskirk, A. M., Feng, N., Sheridan, J. F., and Stevens, V. (1993) Peptide vaccines incorporating a "promiscuous" T-cell epitope bypass certain haplotype restricted immune responses and provide broad spectrum immunogenicity, *J. Mol. Recognit.*, **6**, 81-94, doi: 10.1002/jmr.300060206.
 71. Franke, E. D., Corradin, G., and Hoffman, S. L. (1997) Induction of protective CTL responses against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein by immunization with peptides, *J. Immunol.*, **159**, 3424-3433, doi: 10.4049/jimmunol.159.7.3424.
 72. Wen, X., Wen, K., Cao, D., Li, G., Jones, R. W., Li, J., Szu, S., Hoshino, Y., and Yuan, L. (2014) Inclusion of a universal tetanus toxoid CD4⁺ T cell epitope P2 significantly enhanced the immunogenicity of recombinant rotavirus ΔVP8* subunit parenteral vaccines, *Vaccine*, **32**, 4420-4427, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.060.
 73. Su, Q. D., Zou, Y. N., Yi, Y., Shen, L. P., Ye, X. Z., Zhang, Y., Wang, H., Ke, H., Song, J. D., Hu, K. P., Cheng, B. L., Qiu, F., Yu, P. C., Zhou, W. T., Zhao, R., Cao, L., Dong, G. F., Bi, S. L., Wu, G. Z., Gao, G. F., et al. (2021) Recombinant SARS-CoV-2 RBD with a built in T helper epitope induces strong neutralization antibody response, *Vaccine*, **39**, 1241-1247, doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.044.
 74. Ashton, A. C., Li, Y., Doussau, F., Weller, U., Dougan, G., Poulain, B., and Dolly, J. O. (1995) Tetanus toxin inhibits neuroexocytosis even when its Zn²⁺-dependent protease activity is removed, *J. Biol. Chem.*, **270**, 31386-31390, doi: 10.1074/jbc.270.52.31386.
 75. Li, Y., Aoki, R., and Dolly, J. O. (1999) Expression and characterisation of the heavy chain of tetanus toxin: reconstitution of the fully-recombinant dichain protein in active form, *J. Biochem.*, **125**, 1200-1208, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022404.
 76. Li, Y., Foran, P., Lawrence, G., Mohammed, N., Chan-Kwo-Chion, C. K., Lisk, G., Aoki, R., and Dolly, O. (2001) Recombinant forms of tetanus toxin engineered for examining and exploiting neuronal

- trafficking pathways, *J. Biol. Chem.*, **276**, 31394-31401, doi: 10.1074/jbc.M103517200.
77. Blum, F. C., Przedpelski, A., Tepp, W. H., Johnson, E. A., and Barbieri, J. T. (2014) Entry of a recombinant, full-length, atoxic tetanus neurotoxin into Neuro-2a cells, *Infect. Immun.*, **82**, 873-881, doi: 10.1128/iai.01539-13.
 78. Przedpelski, A., Tepp, W. H., Pellett, S., Johnson, E. A., and Barbieri, J. T. (2020) A novel high-potency tetanus vaccine, *mBio*, **11**, doi: 10.1128/mBio.01668-20.
 79. Chang, M. J., Ollivault-Shiflett, M., Schuman, R., Ngoc Nguyen, S., Kaltashov, I. A., Bobst, C., Rajagopal, S. P., Przedpelski, A., Barbieri, J. T., and Lees, A. (2022) Genetically detoxified tetanus toxin as a vaccine and conjugate carrier protein, *Vaccine*, **40**, 5103-5113, doi: 10.1016/j.vaccine.2022.07.011.
 80. Chang, M., Oganessian, N., and Lees, A. (2021) *Production of Soluble Recombinant Protein*. Patent No. WO 2021/188379 A2.
 81. Janson, H., Hedén, L. O., Grubb, A., Ruan, M. R., and Forsgren, A. (1991) Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*: cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, **59**, 119-125, doi: 10.1128/iai.59.1.119-125.1991.
 82. Munson, R. S., Jr., and Sasaki, K. (1993) Protein D, a putative immunoglobulin D-binding protein produced by *Haemophilus influenzae*, is glycerophosphodiester phosphodiesterase, *J. Bacteriol.*, **175**, 4569-4571, doi: 10.1128/jb.175.14.4569-4571.1993.
 83. Janson, H., Hedén, L. O., and Forsgren, A. (1992) Protein D, the immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*, is a lipoprotein, *Infect. Immun.*, **60**, 1336-1342, doi: 10.1128/iai.60.4.1336-1342.1992.
 84. Akkoyunlu, M., Janson, H., Ruan, M., and Forsgren, A. (1996) Biological activity of serum antibodies to a nonacylated form of lipoprotein D of *Haemophilus influenzae*, *Infect. Immun.*, **64**, 4586-4592, doi: 10.1128/iai.64.11.4586-4592.1996.
 85. Behrouzi, A., Bouzari, S., Siadat, S. D., Jafari, A., and Irani, S. (2015) Molecular cloning, expression and purification of truncated hpd fragment of *Haemophilus influenzae* in *Escherichia coli*, *Jundishapur J. Microbiol.*, **8**, e23218, doi: 10.5812/jjm.23218.
 86. Akkoyunlu, M., Melhus, A., Capiu, C., van Opstal, O., and Forsgren, A. (1997) The acylated form of protein D of *Haemophilus influenzae* is more immunogenic than the nonacylated form and elicits an adjuvant effect when it is used as a carrier conjugated to polyribosyl ribitol phosphate, *Infect. Immun.*, **65**, 5010-5016, doi: 10.1128/iai.65.12.5010-5016.1997.
 87. Croxtall, J. D., and Keating, G. M. (2009) Pneumococcal polysaccharide protein D-conjugate vaccine (Synflorix; PHiD-CV), *Paediatric Drugs*, **11**, 349-357, doi: 10.2165/11202760-000000000-00000.
 88. Novotny, L. A., Jurcisek, J. A., Godfroid, F., Poolman, J. T., Denoël, P. A., and Bakaletz, L. O. (2006) Passive immunization with human anti-protein D antibodies induced by polysaccharide protein D conjugates protects chinchillas against otitis media after intranasal challenge with *Haemophilus influenzae*, *Vaccine*, **24**, 4804-4811, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.021.
 89. Nurkka, A., Joensuu, J., Henckaerts, I., Peeters, P., Poolman, J., Kilpi, T., and Käyhty, H. (2004) Immunogenicity and safety of the eleven valent pneumococcal polysaccharide-protein D conjugate vaccine in infants, *Pediatric Infect. Dis. J.*, **23**, 1008-1014, doi: 10.1097/01.inf.0000143640.03214.18.
 90. Prymula, R., Peeters, P., Chrobok, V., Kriz, P., Novakova, E., Kaliskova, E., Kohl, I., Lommel, P., Poolman, J., Prieels, J. P., and Schuerman, L. (2006) Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study, *Lancet*, **367**, 740-748, doi: 10.1016/s0140-6736(06)68304-9.
 91. Einhorn, M. S., Weinberg, G. A., Anderson, E. L., Granoff, P. D., and Granoff, D. M. (1986) Immunogenicity in infants of *Haemophilus influenzae* type B polysaccharide in a conjugate vaccine with *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein, *Lancet*, **2**, 299-302, doi: 10.1016/s0140-6736(86)90001-2.
 92. Granoff, D. M., Anderson, E. L., Osterholm, M. T., Holmes, S. J., McHugh, J. E., Belshe, R. B., Medley, F., and Murphy, T. V. (1992) Differences in the immunogenicity of three *Haemophilus influenzae* type B conjugate vaccines in infants, *J. Pediatrics*, **121**, 187-194, doi: 10.1016/s0022-3476(05)81186-2.
 93. Liu, M. A., Friedman, A., Oliff, A. I., Tai, J., Martinez, D., Deck, R. R., Shieh, J. T., Jenkins, T. D., Donnelly, J. J., and Hawe, L. A. (1992) A vaccine carrier derived from *Neisseria meningitidis* with mitogenic activity for lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4633-4637, doi: 10.1073/pnas.89.10.4633.
 94. Qi, H. L., Tai, J. Y., and Blake, M. S. (1994) Expression of large amounts of neisserial porin proteins in *Escherichia coli* and refolding of the proteins into native trimers, *Infect. Immun.*, **62**, 2432-2439, doi: 10.1128/iai.62.6.2432-2439.1994.
 95. Fusco, P. C., Michon, F., Laude-Sharp, M., Minetti, C. A., Huang, C. H., Heron, I., and Blake, M. S. (1998) Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine, *Vaccine*, **16**, 1842-1849, doi: 10.1016/s0264-410x(98)00174-1.
 96. Fusco, P. C., Michon, F., Tai, J. Y., and Blake, M. S. (1997) Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates, *J. Infect. Dis.*, **175**, 364-372, doi: 10.1093/infdis/175.2.364.

97. Xia, M., Wei, C., Wang, L., Cao, D., Meng, X. J., Jiang, X., and Tan, M. (2016) Development and evaluation of two subunit vaccine candidates containing antigens of hepatitis E virus, rotavirus, and astrovirus, *Sci. Rep.*, **6**, 25735, doi: 10.1038/srep25735.
98. Ferrari, G., Garaguso, I., Adu-Bobie, J., Doro, F., Taddei, A. R., Biolchi, A., Brunelli, B., Giuliani, M. M., Pizza, M., Norais, N., and Grandi, G. (2006) Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles, *Proteomics*, **6**, 1856-1866, doi: 10.1002/pmic.200500164.
99. Gerke, C., Colucci, A. M., Giannelli, C., Sanzone, S., Vitali, C. G., Sollai, L., Rossi, O., Martin, L. B., Auerbach, J., Di Cioccio, V., and Saul, A. (2015) Production of a *Shigella sonnei* vaccine based on generalized modules for membrane antigens (GMMA), 1790GAHB, *PLoS One*, **10**, e0134478, doi: 10.1371/journal.pone.0134478.
100. Rossi, O., Pesce, I., Giannelli, C., Aprea, S., Caboni, M., Citiulo, F., Valentini, S., Ferlenghi, I., MacLennan, C. A., D'Oro, U., Saul, A., and Gerke, C. (2014) Modulation of endotoxicity of *Shigella* generalized modules for membrane antigens (GMMA) by genetic lipid A modifications: relative activation of TLR4 and TLR2 pathways in different mutants, *J. Biol. Chem.*, **289**, 24922-24935, doi: 10.1074/jbc.M114.566570.
101. Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M. J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A. R., Serino, L., Gomes Moriel, D., Nesta, B., Fontana, M. R., Spagnuolo, A., Pizza, M., Norais, N., and Grandi, G. (2008) Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* DeltatolR IHE3034 mutant, *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 473-485, doi: 10.1074/mcp.M700295-MCP200.
102. Van de Waterbeemd, B., Streefland, M., van der Ley, P., Zomer, B., van Dijken, H., Martens, D., Wijffels, R., and van der Pol, L. (2010) Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process, *Vaccine*, **28**, 4810-4816, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.082.
103. Keiser, P. B., Biggs-Cicatelli, S., Moran, E. E., Schmiel, D. H., Pinto, V. B., Burden, R. E., Miller, L. B., Moon, J. E., Bowden, R. A., Cummings, J. F., and Zollinger, W. D. (2011) A phase I study of a meningococcal native outer membrane vesicle vaccine made from a group B strain with deleted lpxL1 and synX, over-expressed factor H binding protein, two PorAs and stabilized OpcA expression, *Vaccine*, **29**, 1413-1420, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.039.
104. Berlanda Scorza, F., Colucci, A. M., Maggiore, L., Sanzone, S., Rossi, O., Ferlenghi, I., Pesce, I., Caboni, M., Norais, N., Di Cioccio, V., Saul, A., and Gerke, C. (2012) High yield production process for *Shigella* outer membrane particles, *PLoS One*, **7**, e35616, doi: 10.1371/journal.pone.0035616.
105. Koeberling, O., Ispasanie, E., Hauser, J., Rossi, O., Pluschke, G., Caugant, D. A., Saul, A., and MacLennan, C. A. (2014) A broadly-protective vaccine against meningococcal disease in sub-Saharan Africa based on generalized modules for membrane antigens (GMMA), *Vaccine*, **32**, 2688-2695, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.068.
106. Rossi, O., Caboni, M., Negrea, A., Necchi, F., Alfini, R., Micoli, F., Saul, A., MacLennan, C. A., Rondini, S., and Gerke, C. (2016) Toll-like receptor activation by generalized modules for membrane antigens from lipid A mutants of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis, *Clin. Vaccine Immunol.*, **23**, 304-314, doi: 10.1128/cvi.00023-16.
107. Rosenthal, J. A., Huang, C. J., Doody, A. M., Leung, T., Mineta, K., Feng, D. D., Wayne, E. C., Nishimura, N., Leifer, C., DeLisa, M. P., Mendez, S., and Putnam, D. (2014) Mechanistic insight into the TH1-biased immune response to recombinant subunit vaccines delivered by probiotic bacteria-derived outer membrane vesicles, *PLoS One*, **9**, e112802, doi: 10.1371/journal.pone.0112802.
108. Rappazzo, C. G., Watkins, H. C., Guarino, C. M., Chau, A., Lopez, J. L., DeLisa, M. P., Leifer, C. A., Whittaker, G. R., and Putnam, D. (2016) Recombinant M2e outer membrane vesicle vaccines protect against lethal influenza A challenge in BALB/c mice, *Vaccine*, **34**, 1252-1258, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.028.
109. Gujrati, V., Kim, S., Kim, S. H., Min, J. J., Choy, H. E., Kim, S. C., and Jon, S. (2014) Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy, *ACS Nano*, **8**, 1525-1537, doi: 10.1021/nn405724x.
110. Daleke-Schermerhorn, M. H., Felix, T., Soprova, Z., Ten Hagen-Jongman, C. M., Vikström, D., Majlessi, L., Beskers, J., Follmann, F., de Punder, K., van der Wel, N. N., Baumgarten, T., Pham, T. V., Piersma, S. R., Jiménez, C. R., van Ulsen, P., de Gier, J. W., Leclerc, C., Jong, W. S., and Luirink, J. (2014) Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach, *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 5854-5865, doi: 10.1128/aem.01941-14.
111. Gnopo, Y. M. D., Watkins, H. C., Stevenson, T. C., DeLisa, M. P., and Putnam, D. (2017) Designer outer membrane vesicles as immunomodulatory systems – reprogramming bacteria for vaccine delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **114**, 132-142, doi: 10.1016/j.addr.2017.05.003.
112. Micoli, F., Alfini, R., Di Benedetto, R., Necchi, F., Schiavo, F., Mancini, F., Carducci, M., Palmieri, E., Balocchi, C., Gasperini, G., Brunelli, B., Costantino, P., Adamo, R., Piccioli, D., and Saul, A. (2020)

- GMMA is a versatile platform to design effective multivalent combination vaccines, *Vaccines*, **8**, 540, doi: 10.3390/vaccines8030540.
113. Jiang, L., Driedonks, T. A. P., Jong, W. S. P., Dhakal, S., Bart van den Berg van Saparoea, H., Sitaras, I., Zhou, R., Caputo, C., Littlefield, K., Lowman, M., Chen, M., Lima, G., Gololobova, O., Smith, B., Mahairaki, V., Riley Richardson, M., Mulka, K. R., Lane, A. P., Klein, S. L., Pekosz, A., et al. (2022) A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2 protects against disease and elicits neutralizing antibodies to wild-type and Delta variants, *J. Extracell. Vesicles*, **11**, e12192, doi: 10.1002/jev2.12192.
 114. Scaria, P. V., Rowe, C. G., Chen, B. B., Muratova, O. V., Fischer, E. R., Barnafo, E. K., Anderson, C. F., Zaidi, I. U., Lambert, L. E., Lucas, B. J., Nahas, D. D., Narum, D. L., and Duffy, P. E. (2019) Outer membrane protein complex as a carrier for malaria transmission blocking antigen Pfs230, *NPJ Vaccines*, **4**, 24, doi: 10.1038/s41541-019-0121-9.
 115. Palmieri, E., Kis, Z., Ozanne, J., Di Benedetto, R., Ricchetti, B., Massai, L., Carducci, M., Oldrini, D., Gasperini, G., Aruta, M. G., Rossi, O., Kontoravdi, C., Shah, N., Mawas, F., and Micoli, F. (2022) GMMA as an alternative carrier for a glycoconjugate vaccine against group A streptococcus, *Vaccines*, **10**, 1034, doi: 10.3390/vaccines10071034.
 116. Micoli, F., Alfini, R., Di Benedetto, R., Necchi, F., Schiavo, F., Mancini, F., Carducci, M., Oldrini, D., Pitirillo, O., Gasperini, G., Balocchi, C., Bechi, N., Brunelli, B., Piccioli, D., and Adamo, R. (2021) Generalized modules for membrane antigens as carrier for polysaccharides: impact of sugar length, density, and attachment site on the immune response elicited in animal models, *Front. Immunol.*, **12**, 719315, doi: 10.3389/fimmu.2021.719315.
 117. Pavliakova, D., Moncrief, J. S., Lyerly, D. M., Schiffman, G., Bryla, D. A., Robbins, J. B., and Schneerson, R. (2000) *Clostridium difficile* recombinant toxin A repeating units as a carrier protein for conjugate vaccines: studies of pneumococcal type 14, *Escherichia coli* K1, and *Shigella flexneri* type 2a polysaccharides in mice, *Infect. Immun.*, **68**, 2161-2166, doi: 10.1128/iai.68.4.2161-2166.2000.
 118. Lukac, M., Pier, G. B., and Collier, R. J. (1988) Toxoid of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A generated by deletion of an active-site residue, *Infect. Immun.*, **56**, 3095-3098, doi: 10.1128/iai.56.12.3095-3098.1988.
 119. Lukac, M., and Collier, R. J. (1988) Restoration of enzymic activity and cytotoxicity of mutant, E553C, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A by reaction with iodoacetic acid, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6146-6149, doi: 10.1016/S0021-9258(18)68762-9.
 120. Burkhardt, M., Reiter, K., Nguyen, V., Suzuki, M., Herrera, R., Duffy, P. E., Shimp, R., Jr., MacDonald, N. J., Olano, L. R., and Narum, D. L. (2019) Assessment of the impact of manufacturing changes on the physicochemical properties of the recombinant vaccine carrier ExoProtein A, *Vaccine*, **37**, 5762-5769, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.09.037.
 121. Margarit, I., Rinaudo, C. D., Galeotti, C. L., Maione, D., Ghezzi, C., Buttazzoni, E., Rosini, R., Runci, Y., Mora, M., Buccato, S., Pagani, M., Tresoldi, E., Berardi, A., Creti, R., Baker, C. J., Telford, J. L., and Grandi, G. (2009) Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm, *J. Infect. Dis.*, **199**, 108-115, doi: 10.1086/595564.
 122. Park, W. J., Yoon, Y. K., Park, J. S., Pansuriya, R., Seok, Y. J., and Ganapathy, R. (2021) Rotavirus spike protein Δ VP8* as a novel carrier protein for conjugate vaccine platform with demonstrated antigenic potential for use as bivalent vaccine, *Sci. Rep.*, **11**, 22037, doi: 10.1038/s41598-021-01549-z.
 123. Carvalho, R. J., Cabrera-Crespo, J., Tanizaki, M. M., and Gonçalves, V. M. (2012) Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **94**, 683-694, doi: 10.1007/s00253-011-3649-9.
 124. Khan, M. N., and Pichichero, M. E. (2012) Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans, *Vaccine*, **30**, 2900-2907, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.023.
 125. Feng, S., Xiong, C., Wang, G., Wang, S., Jin, G., and Gu, G. (2020) Exploration of recombinant fusion proteins YAPO and YAPL as carrier proteins for glycoconjugate vaccine design against *Streptococcus pneumoniae* infection, *ACS Infect. Dis.*, **6**, 2181-2191, doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00260.
 126. Kapoor, N., Uchiyama, S., Pill, L., Bautista, L., Sedra, A., Yin, L., Regan, M., Chu, E., Rabara, T., Wong, M., Davey, P., Fairman, J., and Nizet, V. (2022) Non-native amino acid click chemistry-based technology for site-specific polysaccharide conjugation to a bacterial protein serving as both carrier and vaccine antigen, *ACS Omega*, **7**, 24111-24120, doi: 10.1021/acsomega.1c07360.
 127. Qian, W., Huang, Z., Chen, Y., Yang, J., Wang, L., Wu, K., Chen, M., Chen, N., Duan, Y., Shi, J., Zhang, Y., and Li, Q. (2020) Elicitation of integrated immunity in mice by a novel pneumococcal polysaccharide vaccine conjugated with HBV surface antigen, *Sci. Rep.*, **10**, 6470, doi: 10.1038/s41598-020-62185-7.
 128. Tsai, C. W., Duggan, P. F., Shimp, R. L., Jr., Miller, L. H., and Narum, D. L. (2006) Overproduction of *Pichia pastoris* or *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria vaccine candidate

- expressed in *P. pastoris*, *J. Biotechnol.*, **121**, 458-470, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.08.025.
129. Prasanna, M., Podsiadla-Bialoskorska, M., Milecki, D., Ruffier, N., Fateh, A., Lambert, A., Fanuel, M., Camberlein, E., Szolajska, E., and Grandjean, C. (2021) On the use of adenovirus dodecahedron as a carrier for glycoconjugate vaccines, *Glycoconjugate J.*, **38**, 437-446, doi: 10.1007/s10719-021-09999-3.
 130. Astronomo, R. D., Kaltgrad, E., Udit, A. K., Wang, S. K., Doores, K. J., Huang, C. Y., Pantophlet, R., Paulson, J. C., Wong, C. H., Finn, M. G., and Burton, D. R. (2010) Defining criteria for oligomannose immunogens for HIV using icosahedral virus capsid scaffolds, *Chem. Biol.*, **17**, 357-370, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.03.012.
 131. Sungsuwan, S., Wu, X., and Huang, X. (2017) Evaluation of virus-like particle-based tumor-associated carbohydrate immunogen in a mouse tumor model, *Methods Enzymol.*, **597**, 359-376, doi: 10.1016/bs.mie.2017.06.030.
 132. Yin, Z., and Huang, X. (2012) Recent development in carbohydrate based anti-cancer vaccines, *J. Carbohydr. Chem.*, **31**, 143-186, doi: 10.1080/07328303.2012.659364.
 133. Li, M., Cripe, T. P., Estes, P. A., Lyon, M. K., Rose, R. C., and Garcea, R. L. (1997) Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly, *J. Virol.*, **71**, 2988-2995, doi: 10.1128/jvi.71.4.2988-2995.1997.
 134. Edman, J. C., Hallewell, R. A., Valenzuela, P., Goodman, H. M., and Rutter, W. J. (1981) Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*, *Nature*, **291**, 503-506, doi: 10.1038/291503a0.
 135. Chen, X., Zhou, W., He, Q., Su, B., Zou, Y. (2021) Preparation, purification and identification of bacteriophage Q β virus-like particles, *China Biotechnol.*, **41**, 42-49, doi: 10.13523/j.cb.2103034.
 136. Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12180-12184, doi: 10.1073/pnas.89.24.12180.
 137. Harding, C. M., and Feldman, M. F. (2019) Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*, *Glycobiology*, **29**, 519-529, doi: 10.1093/glycob/cwz031.
 138. Riddle, M. S., Kaminski, R. W., Di Paolo, C., Porter, C. K., Gutierrez, R. L., Clarkson, K. A., Weerts, H. E., Duplessis, C., Castellano, A., Alaimo, C., Paolino, K., Gormley, R., and Gambillara Fonck, V. (2016) Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a administered to healthy adults: a single-blind, randomized phase I study, *Clin. Vaccine Immunol.*, **23**, 908-917, doi: 10.1128/cvi.00224-16.
 139. Huttner, A., Hatz, C., van den Dobbela, G., Abbanat, D., Hornacek, A., Frölich, R., Dreyer, A. M., Martin, P., Davies, T., Fae, K., van den Nieuwenhof, I., Thoelen, S., de Vallière, S., Kuhn, A., Bernasconi, E., Viereck, V., Kavvadias, T., Kling, K., Ryu, G., Hülde, T., et al. (2017) Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial, *Lancet*, **17**, 528-537, doi: 10.1016/s1473-3099(17)30108-1.
 140. Kaaijk, P., van Straaten, I., van de Waterbeemd, B., Boot, E. P., Levels, L. M., van Dijken, H. H., and van den Dobbela, G. P. (2013) Preclinical safety and immunogenicity evaluation of a nonavalent PorA native outer membrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease, *Vaccine*, **31**, 1065-1071, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.031.
 141. Королева И. С., Королева М. А. (2021) Мировой опыт применения менингококковых вакцин серогруппы В, *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, **20**, 100-107, doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-6-100-107.
 142. Pizza, M., Bekkat-Berkani, R., and Rappuoli, R. (2020) Vaccines against meningococcal diseases, *Microorganisms*, **8**, 1521, doi: 10.3390/microorganisms8101521.

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS AND THEIR DERIVATIVES USED AS CARRIERS FOR CONJUGATE VACCINES

Review

Yu. A. Khodak

*Institute of Bioengineering, FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
117312 Moscow, Russia; e-mail: salix33@gmail.com*

The carrier proteins that provide an effective and long-term immune response to weak antigens has become a real breakthrough in disease prevention, making it available to a wider range of patients and making it possible to obtain reliable vaccines against a variety of pathogens. Currently, research is continuing both to identify new peptides, proteins, and their complexes potentially suitable for use as carriers, and to develop new methods for isolation, purification and conjugation of already known and well-proven proteins. The use of recombinant proteins has a number of advantages over isolation from natural sources, such as simpler cultivation of the host organism, the possibility of modifying the genetic construction, the use of numerous promoter variants, signal sequences, and other regulatory elements. This review is devoted to the methods of obtaining both traditional and new recombinant proteins and their derivatives being used or potentially suitable for use as carrier proteins for conjugate vaccines.

Keywords: heterologous expression of recombinant proteins, conjugate vaccines, carrier proteins