

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 615.371.012.6

С. В. Дентовская<sup>1</sup>, Р. З. Шайхутдинова<sup>1</sup>, Ю. А. Книрель<sup>2</sup>, С. Л. Иванов<sup>1</sup>, А. П. Анисимов<sup>1</sup>КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ  
СО СНИЖЕННОЙ РЕАКТОГЕННОСТЬЮ<sup>1</sup>Государственный научный центр прикладной микробиологии. Оболенск, Московская обл., <sup>2</sup>Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Основным недостатком используемых в настоящее время живых и убитых вакцин на основе грамотрицательных бактерий является высокая реактогенность, определяемая наличием в их составе липополисахарида. В обзоре рассматриваются биосинтез липида А - структурного компонента липополисахарида, отвечающего за его эндотоксическую активность, а также гены, ответственные за его синтез. Особое внимание уделено генно-инженерному способу уменьшения реактогенности вакцинных штаммов, заключающемуся в нокаутном мутагенезе генов *waAM* и(или) *waAN*, отвечающих за присоединение к липиду А вторичных ацильных заместителей — остатков лауриновой и миристиновой кислот.

## Введение

Классические вакцинные препараты, включающие в свой состав антигены, можно подразделить на три типа: "химические" (субъединичные, молекулярные), живые (аттенуированные) и убитые. Между инактивированными (убитыми и "химическими") и живыми (аттенуированными) вакцинами имеются существенные различия. Важным параметром, влияющим на эффективность инактивированной вакцины, является количество содержащегося в ней антигена. В живых вакцинах оно не велико, но и результате размножения в организме вакцинированное животное или человека число введенных микроорганизмов увеличивается в тысячи раз. "Химические" и убитые вакцины приходится вводить в виде нескольких доз, чтобы добиться напряженного иммунного ответа. Во время вакцинального процесса иммунный ответ развивается на многие из антигенов микроорганизма, однако резистентность к инфекции зависит главным образом от иммунного ответа на небольшое число релевантных антигенов, располагающихся на клеточной поверхности. Очевидно, что используемые в настоящее время вакцины, которые состоят из живых и (особенно) из убитых бактерий, индуцируют в значительной степени нерелевантный иммунный ответ, а также обладают выраженной реактогенностью за счет присутствия в их составе экзотоксинов и липополисахаридов (ЛПС) [1, 6].

"Химические" вакцины позволяют за счет введения в их состав только иммунодоминантных антигенов или кодирующих их генов значительно снизить реактогенность препарата в целом, эффективны для ревакцинации, могут быть использованы на фоне экстренной профилактики антибиотиками и исключают возможность возникновения инфекционного процесса у лиц с нарушениями иммунного статуса. Однако вакцины, сконструированные на основе одного двух индивидуальных иммунодоминантных антигенов или кодирующих их генов (в случае ДНК-вакцин), не являются идеальными, так как не могут обеспечить защиту от всех вирулентных вариантов возбудителя инфек-

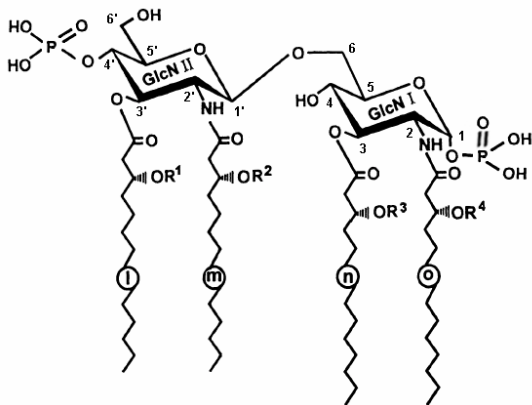
ции. Отсутствие у патогена антигенов, используемых в составе вакцины, или присутствие их серологически различающихся вариантов позволяют измененным формам микроорганизмов уклоняться от иммунитета, индуцированного подобной вакцинацией [9].

В конечном счете тип используемой вакцины определяется особенностями патогенеза инфекционного заболевания и широтой спектра антигенной изменчивости его возбудителя. Так, патогенез дифтерии или столбняка определяется прежде всего действием дифтерийного токсина или нейротоксина - тетаноспазмина, а иммунитет является преимущественно гуморальным. В связи с этим для специфической профилактики данных инфекций используют адсорбированные анатоксины (АД-М-анатоксин и АС-анатоксин). Из 12 сероваров менингококков наиболее часто вызывают септицемию и развитие менингита бактерии вариантов А, В и С, и для специфической профилактики используют вакцину на основе секретируемых в культуральную среду полисахаридов сероваров А и С. Вакцина против внутрибольничной синегнойной инфекции представляет собой смесь убитых культур штаммов 7 сероваров синегнойной палочки. Живые вакцины на основе аттенуированных штаммов используют для профилактики бруцеллеза, туляремии, чумы и других инфекционных заболеваний [6].

Основным недостатком используемых в настоящее время живых и убитых вакцин на основе грамотрицательных бактерий является высокая реактогенность, определяемая наличием в их составе ЛПС (эндотоксина) [2, 6, 19, 40]. Таким образом, для снижения реактогенности этих вакцин необходимо снизить токсичность входящего и их состав ЛПС.

## Взаимосвязь структуры и эндотоксической активности ЛПС. Биосинтез липида А

ЛПС вместе с белковыми компонентами формирует мозаичную структуру наружного слоя внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Полная молекула ЛПС содержит гидрофобную часть — липид А, к которой через олигосахарид, называемый кором, присоединяется О-антигенный полисахарид. Эта так называемая S-форма ЛПС (smooth - гладкий) характерна для большинства представителей семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Pasteurellaceae* и *Vibrionaceae*, а также других грамотрицательных бактерий "дикого" типа, образующих колонии гладкой формы [5, 41]. Микроорганизмы, формирующие колонии ше-



стиновой кислотой в положениях 2, 3, 2' и 3' и фосфорилированный в положениях 1 и 4' (рис. 1) [39,53]. Гидроксильная группа в положении 6 остатка GlcN II служит местом присоединения олигосахарида кора [4, 40]. Последние этапы биосинтеза липида А включают присоединение вторичных жирнокислотных остатков. Например, у сальмонелл и эшерихий остатки лауриновой (C12:O) и миристиновой (C14:O) кислот присоединяются к остатку GlcN II в положения 2' и 3' с образованием несимметричной (4+2) структуры липида А (рис. 1). В имеющем симметричную (3+3) структуру липиде А *Neisseria meningitidis* остатки 3-гидроксимиристиновой кислоты в положениях 2 и 2' несут вторичные ацильные заместители 12:0, а в положениях 3 и 3' находятся неацелированные остатки 3-гидроксилауриновой кислоты [29].

Ферменты и гены, отвечающие за консервативные этапы биосинтеза липида А, первоначально были выявлены и охарактеризованы для *E. coli*, а затем и для других бактерий (рис. 2) и подробно рассмотрены в обзорной работе С.Р.Н. Raetz, С. Whitfield [41]. Ацилтрансферазы, отвечающие за присоединение к липиду А вторичных ацильных заместителей - остатков лауриновой и миристиновой кислот, кодируются генами *waaM* (также обозначаемый как *htrB* или *lpxL*) и *waaN* (также обозначаемый как *msbB* или *lpxM*) соответственно. Оба фермента, кодируемых этими генами, являются Kdo-зависимыми (Kdo - 3-дезоксид-D-манноокт-2-улозоновая (кетодезоксиоктоновая) кислота), то есть требуют ее предварительного присоединения к остатку GlcN II [11, 15, 34, 41, 49]. *waaM* был впервые описан как ген, необходимый для роста *E. coli* на богатых средах при температурах культивирования, превышающих 33 °С, в то время как *waaN* был идентифицирован как один из мультикопийных супрессоров *waaM* [25, 26, 42]. При оптимальном протекании реакции биосинтеза продукт гена *waaM* переносит лаурат на Kdo<sub>2</sub>-lipid IV<sub>A</sub>, после чего ацилтрансфераза, кодируемая *waaN*, добавляет миристан, что ведет к полностью ацилированному липиду А (рис. 2). Нуклеотидные последовательности обоих генов гомологичны на 27,5 %.

Исследование препаратов липида А, выделенных из различных бактерий "дикого" типа, и их синтетических аналогов показало, что для проявления полного токсического эффекта необходимо присутствие дисахаридной основы, несущей две фосфатные группы и шесть остатков жирных кислот, расположенных также, как в липиде А *E. coli* (рис. 1). Молекулы, лишённые одного из этих компонентов или имеющие другое их расположение, заметно менее активны или вовсе не обладают эндотоксической активностью [8].

### Конструирование и биологические свойства *waaM*- и *waaN*-мутантов

К настоящему времени сконструированы штаммы с мутациями в *waaM*- и/или *waaN*- генах *E. coli* [45, 46], *Haemophilus influenzae* [30], *S. enterica* [28, 31], *N. meningitidis* и *Neisseria gonorrhoeae* [51; 36], *Shigella flexneri* [16], *Y. pestis* [7, 3] и *Y. pseudotuberculosis* [3].

*waaM*- и *waaN*-мутанты *E. coli*. Впервые *waaN* нокаутный мутант был получен J. Somerville и со-

Источник липида А	Длина цепи (число атомов С) в первичных ацильных заместителях				Вторичные ацильные заместители			
	l	m	n	o	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i>	14	14	14	14	14:0	12:0	H	H
<i>Y. pestis</i>	14	14	14	14	12:0	16:1	H	H
<i>Yersinia pseudotubercu-</i>	14	14	14	14	H	16:0	16:0	H
<i>N. meningitidis</i>	12	14	12	14	H	12:0	H	12:0

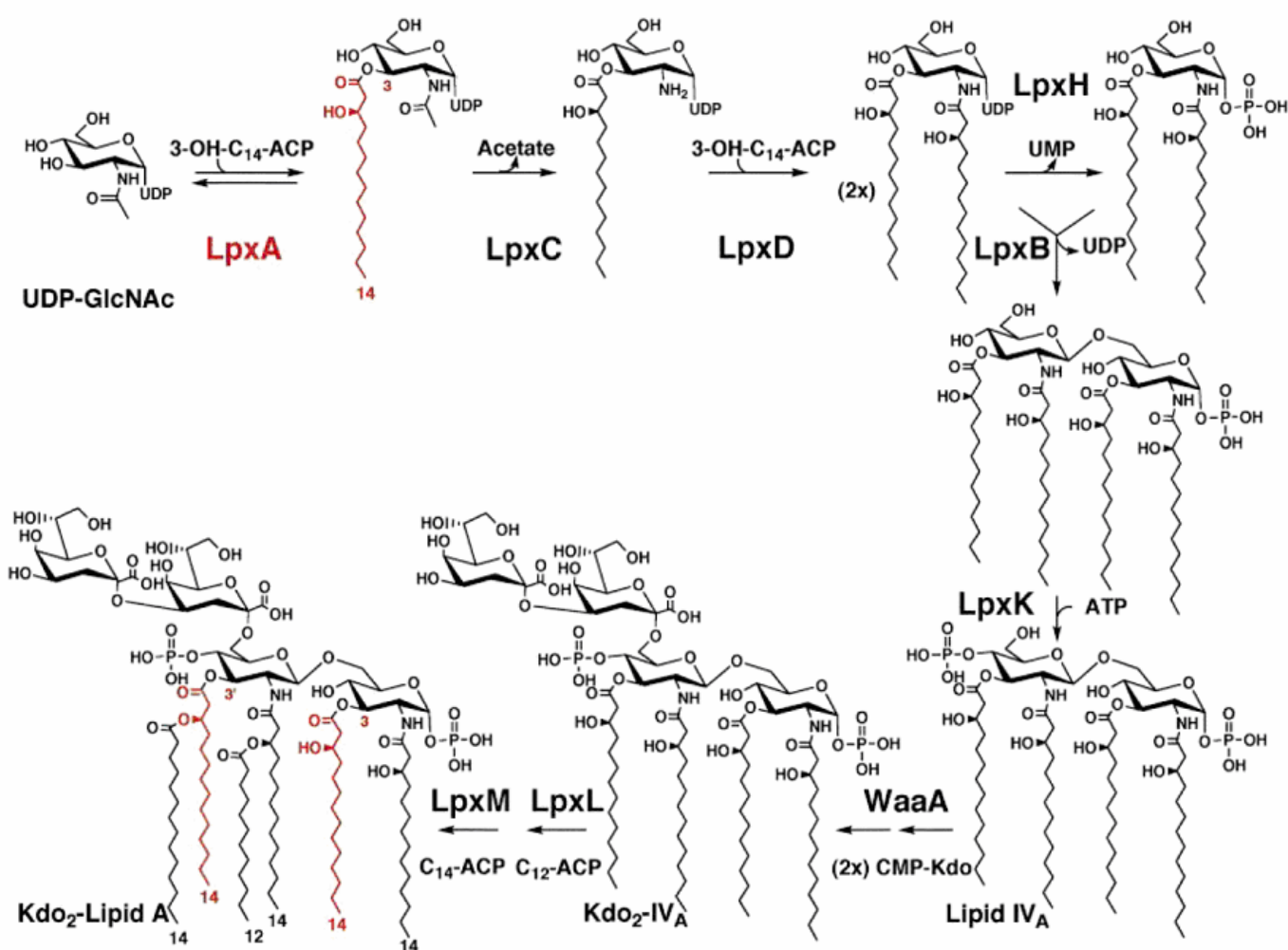
Рис 1. Структура гексаацелированной формы липида А некоторых бактерий (по данным [13]).

У некоторых бактерий могут присутствовать более (*E. coli*, *S. enterica*) или менее (*Y. pestis*) высокоацелированные формы липида А. Фосфатные группы липида А могут нести полярные заместители, такие как этаноламин, фосфоэтанолламин или 4-амино-4-дезоксисарабиноза.

роховатой формы, являются природными или искусственно полученными R-мутантами (rough - шероховатый), продуцирующими молекулы ЛПС, лишённые полисахаридной цепи. R-форма ЛПС характерна для клинических и природных изолятов *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Branhamella* spp., *Bordetella pertussis*, и *Yersinia pestis* [12, 21, 32, 37, 38, 44, 52].

В организме млекопитающих липид А, ответственный за эндотоксические свойства ЛПС, вызывает такие патофизиологические эффекты, как лихорадка, тахикардия, лейкопения и гипотензия, являющиеся симптомами сепсиса и септического шока. Молекулярные механизмы этих эффектов включают в себя активацию различных клеток хозяина, в частности, моноцитов и макрофагов, ведущую к секреции окиси азота, вазоактивных липидов, биоактивных медиаторов (цитокинов): IL-1 (interleukin), IL-6, IL-12 и TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) [22, 43]. В низких концентрациях цитокины необходимы для функционирования иммунной системы и ее борьбы с внедрившимися микроорганизмами, тогда как в высоких концентрациях они вызывают токсические эффекты.

Химическое строение липида А в настоящее время достаточно хорошо изучено. У всех энтеробактерий и многих других грамотрицательных бактерий липид А содержит в своей основе бисфосфорилированный дисахарид, построенный из двух  $\beta$ (1'-6)-связанных остатков D-глюкозамина (GlcN I и GlcN II), ацилированный (R)-3-гидроксимири-



Ген	Фермент	Функция фермента	Продукт реакции
<i>lpxA</i>	ацилтрансфераза LpxA	перенос 3-гидроксимиристиновой кислоты с белкового носителя (ACP, acyl-carrier-protein) на 3-гидрокси-группу UDP-GlcNAc	UDP-3-O-(3-гидрокси-миристоил)-GlcNAc
<i>lpxC</i>	деацетилаза LpxC	удаление N-ацетильной группы из UDP-3-ацил-GlcNAc	UDP-3-O-(3-гидрокси-миристоил)-GlcNAc
<i>lpxD</i>	ацилтрансфераза LpxD	перенос 3-гидроксимиристиновой кислоты с ACP на 2-аминогруппу UDP-3-ацил-GlcNAc	UDP-2,3-ди-O-(3-гидрокси-миристоил)-GlcNAc
<i>lpxH</i>	пирофосфатаза LpxH	расщепление пирофосфатной связи в UDP-2,3-диацил-GlcNAc	2,3-ди-O-(3-гидроксимристоил)-GlcNAc-1-фосфат (липид X)
<i>lpxB</i>	дисахарид-синтаза LpxB	конденсация липида X с UDP-2,3-диацил-GlcNAc	1-монофосфорилированный дисахарид
<i>lpxK</i>	киназа LpxK	фосфорилирование дисахарида в положении 4'	1,4'-бисфосфорилированный дисахарид (липид IV <sub>A</sub> )
<i>waaA</i>	трансфераза WaaA	присоединение двух остатков Kdo к липиду IV <sub>A</sub>	Kdo <sub>2</sub> -липид IV <sub>A</sub>
<i>waaM</i>	ацилтрансфераза WaaM	перенос лауриновой кислоты с ACP на 3-гидроксимиристиновую кислоту в положении 2' остатка GlcN II	Kdo <sub>2</sub> -липид A
<i>waaN</i>	ацилтрансфераза WaaN	перенос миристиновой кислоты с ACP на 3-гидроксимиристиновую кислоту в положении 3' остатка GlcN II	

Рис 2. Путь биосинтеза области Kdo<sub>2</sub>-липид A в штамме *E. coli* K-12 и гены, ответственные за синтез липида A (из обзора [41]).

авт. [45] на модели штамма *E. coli* K-12. Химический анализ ЛПС, выделенного из мутантного штамма, подтвердил отсутствие остатка миристиновой кислоты и формирование пентаацильной структуры липидной части молекулы. Исходный штамм кишечной палочки и его *waaN*-мутант не отличались по скорости роста. Изменение структуры ЛПС мутантного штамма вело к филаментации клеток, выращенных при температуре 37 °C, но не при 30 °C, снижению в популяции числа бактерий, образующих капсулы, увеличению депозиции C3-компонента комплемента и возрастанию

фагоцитоза как опсонизированных, так и не опсонизированных клеток. Мутантный штамм оставался устойчивым к бактерицидному действию сыворотки [46].

Живые бактерии *waaN*-мутанта штамма *E. coli* K-12 и полученные из них препараты ЛПС характеризовались 1000-10000-кратным снижением способности стимулировать продукцию E-селектина эндотелиоцитами и TNF- $\alpha$  моноцитами человека [45]. Известно, что одни и те же структурные варианты липида A оказывают разнонаправленное действие на индукцию эндотоксического эффекта у

человека и мыши. Так, липид IV<sub>A</sub> кишечной палочки (рис. 2) действовал *in vitro* как антагонист ЛПС, когда тестировался с фагоцитами человека, но являлся сильным агонистом в мышинных фагоцитах. Данные отличия связывают с различиями в специфичности ЛПС-рецепторов человека и мыши [17,20]. Действительно, на модели мышей не было отмечено достоверного снижения токсичности препаратов ЛПС, изолированных из *waaN*-мутанта, по сравнению с ЛПС из исходного штамма *E. coli* JM83 [46]. Полученный *waaN*-мутант клинического изолята *E. coli* H16 характеризовался всего 10-кратным возрастанием величины ЛД<sub>50</sub> для BALB/с-мышей по сравнению с исходным штаммом [46].

D.M. Hone *et al.* [23] показали, что стимуляция моноцитов периферической крови человека препаратом ЛПС, изолированным из штамма *E. coli* с мутациями в генах *waaM* и *waaN*, в отличие от ЛПС исходного штамма не индуцирует измеримых уровней продукции TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Более того, при одновременном введении с полноценным ЛПС мутантный вариант выступал в качестве антагониста секреции TNF- $\alpha$ .

***waaM*- и *waaN*-мутанты *S. enterica* sv. Typhimurium.** Большинство исследователей считают, что отсутствие дефектов роста у *waaN*-мутантов *E. coli* K-12 и *S. enterica* sv. Typhimurium [26, 28, 45, 50] по сравнению с другими мутациями в липиде А, являющимися или летальными для клетки, или приводящими к формированию температурочувствительного фенотипа, как в случае с *waaM* мутантами [25], свидетельствует о том, что миристиновая кислота не играет существенной роли в барьерной функции внешней мембраны клетки. Однако, по данным S.R. Murray *et al.* [33], *waaN*-мутанты *S. enterica* sv. Typhimurium, в отличие от подобных мутантов лабораторных штаммов *E. coli*, проявляли необычный характер роста. Культивирование бактерий в Lauria-Bertani (LB) бульоне при температуре 37 °C вело к удлинению, раздуванию клеток и практически прекращению их роста. В то же время мутантный штамм хорошо рос на LB-агаре, не содержащем хлорида натрия, или LB-бульоне и агаре без хлорида натрия, но содержащих ионы магния и кальция. Так как ЛПС является жизненно важным структурным компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий, можно предположить, что дефекты в его молекуле могут приводить к появлению вторичных мутаций. Действительно, экстрагенные компенсаторные мутации, частично супрессирующие дефекты роста, возникали с высокой частотой ( $\sim 10^{-4}$ ), и подобные клоны значительно обгоняли в скорости роста колонии исходных *waaN*-мутантов. Была идентифицирована одна из данных мутаций – рецессивная IS10 вставка в ген *somA*, функция которого в настоящий момент неизвестна.

Подобно препаратам ЛПС из *waaN*-мутантов *E. coli* липополисахариды из *waaN*-мутантов *S. enterica* sv. Typhimurium, описанные S.A. Khan *et al.* [28] и K.B. Low *et al.* [31], обладали сниженной эндотоксичностью по сравнению с ЛПС штаммов дикого типа. Так, липид А из *waaN*-мутанта C5 этой бактерии характеризовался сниженной способностью индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов и NO у мышей *in vitro* и *in vivo*. Мутантные бак-

терии не проявляли снижения жизнеспособности при повышении температуры культивирования и синтезировали полноразмерные О-антиген-содержащие молекулы ЛПС, лишенные остатка миристиновой кислоты. При внутривенном заражении BALB/с мышей кинетика размножения мутантного и исходного штаммов *S. typhimurium* C5 была подобна. Однако, вызывая высокие уровни обсемененности селезенки и печени ( $\sim 10^9$  бактерий на орган), мутантный штамм приводил к гибели лишь 10 % животных, в то время как 100 % BALB/с мышей, зараженных штаммом дикого типа, гибли при обсемененности  $\sim 10^8$  бактерий на орган [28].

R. Kalupahana *et al.* [24] исследовали влияние мутации по гену *waaN* в клетках *S. enterica* sv. Typhimurium на стимуляцию дендритных клеток, являющихся центральным звеном индукции иммунного ответа. Установлено, что лишенный миристиновой кислоты липид А характеризовался двукратным снижением способности индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , а также iNOS (inducible nitric oxide synthase) в дендритных клетках и макрофагах мыши, обработанных живыми или инактивированными нагреванием сальмонеллами. При этом снижение эндотоксической активности зависело от соотношения числа бактериальных и дендритных клеток ИМИ (индекс множественности инфекции) и проявлялось только при значениях ИМИ 0,5 и ниже. S.A. Khan *et al.* [28] использовали в своей работе ИМИ = 0,05. По данным R. Kalupahana *et al.* [24] при ИМИ = 5 и выше потеря вторичной миристиновой группы в липиде А *S. enterica* sv. Typhimurium не влияла на его эндотоксические свойства. Подобные результаты получены также G.L. Dixon *et al.* [18], обнаружившими отсутствие снижения уровней цитокиновой индукции при стимуляции дендритных клеток человека *lpxA*-мутантом *N. meningitidis*, лишенным ЛПС, при высоких значениях ИМИ.

Показана возможность использования аттенуированных с помощью ауксотрофных мутаций штаммов сальмонелл в качестве противоопухолевых агентов, предпочтительно размножающихся в опухолевых тканях и продуцирующих ферменты, обладающие противоопухолевой активностью [35]. Однако, необходимость внутривенного введения бактерий, ЛПС которых способен индуцировать TNF- $\alpha$ -опосредованный септический шок, является значительным ограничением в их применении. Данная проблема была решена методом генетической модификации липида А. По данным K.B. Low *et al.* [31] *waaN*-мутант штамма YS72 *S. enterica* sv. Typhimurium (гиперинвазивный, *purI*, *xyl*) сохранял способность аккумулироваться в опухолевых тканях, имплантированных мышам подкожно, и подавлять их рост. В отличие от ЛПС, выделенного из дикого штамма, который в дозе 1 нг был способен индуцировать детектируемые уровни продукции TNF- $\alpha$  моноцитами периферической крови человека, достигавшие максимальных значений при концентрации 10 нг, ЛПС из *waaN*-мутанта не генерировал ответа в дозе 100 мкг. Данный мутант характеризовался 10000-кратным, по сравнению с исходным штаммом, возрастанием величины ЛД<sub>50</sub> для мышей C57B6. Таким образом, подобная

модификация липида А опухолево-специфических бактериальных векторов позволяет предотвратить развитие септического шока и подтверждает, что антиопухолевая активность этих бактерий не зависит от индукции TNF- $\alpha$ . Последующее удаление маркеров устойчивости к антибиотикам позволило получить генетически стабильный после множества генераций (> 140 генераций *in vitro* и пять дней роста в опухоли *in vivo*) чувствительный к антибиотикам дериват VNP20009 *S. enterica* sv. Typhimurium [14]. Мутация в гене *waaN* приводила к незначительному замедлению роста бактерий на LB-агаре. Возрастание скорости роста коррелировало с ростом устойчивости к (этилендиоксид)этилендинитрилтетрауксусной кислоте (EGTA) и являлось следствием компенсирующих мутаций вне гена *waaN*. EGTA<sup>R</sup> фенотип был использован авторами как стабильный маркер. Через 24 ч после внутривенного введения мышам и нечеловекообразным обезьянам в дозе  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл штамм VNP20009 *S. enterica* sv. Typhimurium не высевался из крови. Доклинические токсикологические исследования на обезьянах подтвердили безопасность внутривенного введения мутантного штамма.

***waaM*- и *waaN*-мутанты *N. meningitidis*.** В отличие от *E. coli* и большинства других грамотрицательных бактерий менингококки способны расти без ЛПС при инактивации *lpxA*, который кодирует ацилтрансферазу, необходимую для начального этапа биосинтеза липида А [47]. P. Van der Ley *et al.* [51] идентифицировали в последовательностях геномов *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* гомологи генов *waaM* и *waaN*. Процент гомологии идентифицированных генов с *waaM E. coli* несколько выше, чем с *waaN*, что согласуется с отсутствием в липиде А *N. meningitidis* ацилирования в положении 3' (рис. 1). Химический анализ ЛПС из штамма *N. meningitidis* с инактивированным геном *waaM* показал пентаацильную структуру липида А, в которой отсутствовала вторичная лауриновая кислота в положении 2' остатка GlcN II. При иммунизации мышей клетками *N. meningitidis* "дикого" типа было показано, что образующиеся бактерицидные антитела являются главным образом Р<sub>0</sub>А-специфичными, а ЛПС функционирует как адьювант, но не иммуноген [48]. Липополисахарид мутантного штамма при совместном введении с комплексом белков внешней мембраны *N. meningitidis* сохранял адьювантную активность в отношении белых мышей при одновременном 100-кратном по сравнению с исходным штаммом снижении индукции TNF- $\alpha$  клеточной линией человеческих макрофагов Моно-Мас-6. Подобная комбинация сниженной токсичности и сохраненной адьювантной активности впервые описана для бактериального штамма, содержащего мутации в генах *waaN* или *waaM*, и, возможно, связана с уникальным строением липида А *N. meningitidis*, в частности, с отсутствием в нем кислоты 14:0.

***waaN*-мутанты *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.** *waaN* мутанты *Y. pestis* были получены на основе вакцинного штамма EV линии НИИЭГ и аттенуированных штаммов KM218 и KIMD1, а аналогичные мутанты *Y. pseudotuberculosis* на основе штамма 4573 [7, 3]. Бактерии мутантных штаммов, как и *waaN* мутанты *S. enterica* sv. Typhimurium,

практически не росли на агаре Хоттингера, но хорошо росли на агаре Хоттингера без хлорида натрия. Компенсаторные мутации, супрессирующие дефекты роста, возникали после трех-четырех пассажей рекомбинантных штаммов на жидких питательных средах, содержащих хлорид натрия. Полученные мутанты практически не отличались от штаммов "дикого типа" по культуральным свойствам. Изучение химической структуры ЛПС, изолированного из *waaN*-мутанта *Y. pestis* KM218msbB, выращенного при температуре 25 °С, подтвердило отсутствие гексаацильных вариантов липида А. На модели активности D-сенсбилизированных мышей мутантные бактерии *Y. pestis* и выделенные из них препараты ЛПС были в 4-10 раз менее токсичны, чем их исходные варианты. Вирулентность для белых мышей *waaN*-мутанта *Y. pseudotuberculosis* (ЛД<sub>50</sub> =  $7,2 \times 10^6$  КОЕ) снизилась, по сравнению с исходным штаммом (ЛД<sub>50</sub> =  $4,1 \times 10^4$  КОЕ), на два порядка.

### Заключение

Суммируя вышеизложенное, отметим, что установление структурно-функциональной организации ЛПС позволило приступить к направленному конструированию штаммов грамотрицательных бактерий, обладающих сниженной на несколько порядков эндотоксической активностью. Можно ожидать, что использование мутантов с редуцированным числом вторичных ацильных заместителей в липиде А в качестве продуцентов биологически активных веществ для фармацевтической промышленности даст возможность значительно повысить степень очистки конечного продукта от эндотоксина. Уже проведены доклинические испытания штамма *S. enterica* sv. Typhimurium VNP20009, разработанного для терапии онкологических заболеваний.

Использование аттенуированных *waaN*- и *waaM*-мутантов в качестве вакцинных штаммов может привести к разработке нового поколения живых и убитых вакцин, обладающих пониженной реактогенностью. Принимая во внимание то, что одни и те же структурные варианты липида А могут вызывать эндотоксические эффекты разнонаправленного действия у человека и мыши [17] или отличаться по степени токсичности для этих видов на несколько порядков [27, 45, 46], можно прогнозировать, что наиболее выраженный эффект снижения реактогенности будет проявляться при клиническом применении подобных вакцин, а не при их испытаниях на лабораторных животных.

Учитывая, что *waaN*-мутанты, в отличие от бактерий, дефектных по гену *waaM*, не являются температурочувствительными [26], именно они являются оптимальными для конструирования живых вакцин, так как в ходе развития вакцинального процесса бактерии должны одну-две недели персистировать в макроорганизме при температурах выше 36 °С. В свою очередь, *waaM*-мутанты могут быть использованы при температурах культивирования, не превышающих 33 °С, в качестве основы для убитых вакцин.

## Благодарности

Рисунок 2 воспроизведен из журнала *Annual Review of Biochemistry*, Volume 71, © 2002 по разрешению издательства *Annual Reviews* ([www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)) и авторов статьи: C.R.H. Raetz и C. Whitfield.

Обзор подготовлен в рамках партнерского проекта *International Science & Technology Center (ISTC) #1197p*, поддержанного программой *Cooperative Threat Reduction (CTR)* Департамента Обороны США.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галазка А. Общая иммунология. Иммунологические основы иммунизации. - Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1993. - 28 с.
2. Дмитровский А.М. // Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994. - С. 15-16.
3. Изучение молекулярных основ патогенности возбудителей особо опасных и социально значимых инфекций: Отчет о НИР (заключительный) / ГИЦ прикладной микробиологии - УДК 578.76; 616.9; № ГР 0120.0 409071; Инв. № 0220.0 405040. - Оболенск, 2003. - 55 с.
4. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. // Биохимия. - 1993. - Т. 58., вып. 2. - С. 166-181.
5. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. // Биохимия. - 1994. - Т. 59, вып. 12. - С. 1784-1851.
6. Медунцын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х, 1997. - 272 с.
7. Шайхутдинова Р.З., Мокриевич А.Н., Дентовская С.В., Анисимов А.П. // Успехи современного естествознания. - 2003. - № 10. - С. 108
8. Alexander C., Rietschel E.T. // *J Endotoxin Res.* - 2001. - V. 7. - P. 167-202.
9. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2004. - V. 17. - P. 434-464.
10. Aussel L., Thérissod H., Karibian D., Perry M.B., Bruneteau M., Caroff M. // *FEBS Letters.* - 2000. - V. 465. - P. 87-92.
11. Brozek K.A., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* - 1990. - V. 265. - P. 15410-15417.
12. Chart H., Cheasty T., Rowe B. // *Lett. Appl. Microbiol.* - 1995. - V. 20. - P. 369-370.
13. Christian A., Zähringer U. // *Trends Glycosci. Glycotechnol.* - 2002. - V. 14. - P. 69-86.
14. Clairmont C., Lee K.C., Pike J., Ittensohn M., Low K.B., Pawelek J., Bermudes D., Brecher S.M., Margitich D., Turnier J., Li Z., Luo X., King I., Zheng L.M. // *J. Infect. Dis.* - 2000. - V. 181. - P. 1996-2002.
15. Clementz T., Zhou Z., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* - 1997. - V. 272. - P. 10353-10360.
16. d'Hauteville H., Khan Sh., Maskell D.J. // *J Immunol.* - 2002. - V. 168. - P. 5240-5251.
17. Delude R.L., Savedra R., Zhao Jr.H., Thieringer R., Yamamoto S., Fenton M.J., Golenbock D.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1995. - V. 92. - P. 9288-9292.
18. Dixon G.L., Newton P.J., Chain B.M., Katz D., Andersen S.R., Wong S., van der Ley P., Klein N., Callard R.E. // *Infect. Immun.* - 2001. - V. 69. - P. 4351-4357.
19. Galanos C., Freudenberg M.A. // *Immunobiology.* - 1993. V. 187. - P. 346-356.
20. Golenbock D.T., Hampton R.Y., Qureshi N., Takayama K., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* - 1991. - V. 266. - P. 19490-19498.
21. Hitchen P.G., Prior J.L., Oyston P.C., Panico M., Wren B.W., Titball R.W., Morris H.R., Dell A. // *Mol. Microbiol.* - 2002. - V. 44. - P. 1637-1650.
22. Holst O., Ulmer A.J., Brade H., Flad H.D., Rietschel E.T. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 1996. - V. 16. - V. 83-104.
23. Hone D.M., Powell J., Crowley R.W., Maneval D., Lewis G.K. // *J. Hum. Virol.* - 1998. - V. 1. - P. 251-256.
24. Kalupahana R., Emilianus A.R., Maskell D., Blacklaws B. // *Infect. Immun.* - 2003. - V. 71. - P. 6132-6140.
25. Karow M., Fayet O., Cegielska A., Ziegelhoffer T., Georgopoulos C. // *J. Bacteriol.* - 1991. - V. 173. - V. 741-750.
26. Karow M., Georgopoulos C. // *J. Bacteriol.* - 1992. - V. 174. - V. 702-710.
27. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H., Lindner B., Matsuura, M. // *Infect. Immun.* - 2002. - V. 70. - P. 4092-4098.
28. Khan S.A., Everest P., Servos S., Foxwell N., Zähringer U., Brade H., Rietschel E.Th., Dougan G., Charles I.G., Maskell D.J. // *Mol. Microbiol.* - 1998. - V. 29. - P. 571-579.
29. Kulshin V.A., Za'hriinger U., Lindner B., Frascch C.E., Tsai C., Dimitriev A., Rietschel E.T. // *J. Bacteriol.* - 1992. - V. 174. - P. 1793-1800.
30. Lee N., Sunshine M., Engstrom J., Gibson B., Apicella M.A. // *J. Biol. Chem.* - 1995. - V. 270. - P. 27151-27159.
31. Low K.B., Ittensohn M., Le T., Plat J., Sodi S., Amoss M., Ash O., Carmichael L., Chakraborty A., Fisher J., Lin S.L., Luo X., Miller S.I., Zheng L., King I., Pawelek J.M., Bermudes D. // *Nat. Biotechnol.* - 1999. - V. 17. - P. 37-41.
32. Mandrell R.E., Apicella M.A. // *Immunobiology.* - 1993. - V. 187. - P. 382-402.
33. Murray S.R., Bermudes D., de Felipe K.S., Low K.B. // *J. Bacteriol.* - 2001. - V. 183. - P. 5554-5561.
34. Nichols W.A., Raetz C.R.H., Clementz T., Smith A.L., Hanson J.A., Ketterer M.R., Sunshine M., Apicella M.A. // *J. Endotoxin Res.* - 1997. - V. 4. - P. 163-172.
35. Pawelek J.M., Low K.B., Bermudes D. // *Cancer Research.* - 1997. - V. 57. - P. 4537-4544.
36. Post D.M.B., Phillips N.J., Shao J.Q., Entz D.D., Gibson B.W., Apicella M.A. // *Infect. Immun.* - 2002. - V. 70. - P. 909-920.
37. Prior J.L., Hitchen P.G., Williamson E.D., Reason A.J., Morris H.R., Dell A., Wren B.W., Titball R.W. // *Microb. Pathog.* - 2001. - V. 30. - V. 49-57.
38. Prior J.L., Parkhill J., Hitchen P.G., Mungall K.L., Stevens K., Morris H.R., Reason A.J., Oyston P.C.F., Dell A., Wren B.W., Titball R.W. // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2001. - V. 197. - P. 229-233.
39. Que N.L.S., Ribeiro A.A., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 275. - P. 28017-28027.
40. Raetz C.R.H. // *Annu. Rev. Biochem.* - 1990. - V. 59. - P. 129-170.
41. Raetz C.R.H., Whitfield C. // *Annu. Rev. Biochem.* - 2002. - V. 71. - P. 635-700.
42. Reeves P.R., Hobbs M., Valvano M.A., Skurnik M., Whitfield C., Coplin D., Kido N., Klena J., Maskell D., Raetz C.R.H., Rick P.D. // *Trends Microbiol.* - 1996. - V. 4. - P. 495-503.
43. Rietschel E.Th., Brade H., Holst O., Brade L., Müller-Loennies S., Mamat U., Za'hriinger U., Beckmann F., Seydel U., Brandenburg K., Ulmer A.J., Mattern T., Heine H., Schletter J., Hauschildt S., Loppnow H., Schönbeck U., Flad H.-D., Schade U.F., Di Padova F., Kusumoto S., Schumann R.R. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 1996. - V. 216. - P. 39-81.
44. Skurnik M., Peippo A., Ervelä E. // *Mol. Microbiol.* - 2000. - V. 37. - P. 316-330.
45. Somerville J. E., Cassiano L., Bainbridge B., Cunningham M.D., Darveau R.P. // *J. Clin. Investig.* - 1996. - V. 97. - P. 359-365.
46. Somerville J.E., Cassiano L., Darveau R.P. // *Infect. Immun.* - 1999. - V. 67. - P. 6583-6590.
47. Steeghs L., den Hartog R., den Boer A., Zomer B., van der Ley P. // *Nature.* - 1998. - V. 392. - P. 449-450.
48. Steeghs L., Kuipers B., Hamstra H.J., Kersten G., van Alphen L., van der Ley P. // *Infect. Immun.* - 1999. - V. 67. - P. 4988-4993.
49. Sunshine M.G., Gibson B.W., Engstrom J.J., Nichols W.A., Jones B.D., Apicella M.A. // *J. Bacteriol.* - 1997. - V. 179. - P. 5521-5533.
50. Vaara M., Nurminen M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1999. - V. 43. - P. 1459-1462.
51. van der Ley P., Steeghs L., Hamstra H.J. // *Infect. Immun.* - 2001. - V. 71. - P. 6132-6140.
52. Vinogradov E.V., Lindner B., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Holst O., Gremyakova T.A., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. // *Carbohydr. Res.* - 2002. - V. 337. - P. 775-777.
53. Zähringer U., Lindner B., Rietschel E.T. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* - 1994. - V. 50. - P. 211-276.

Поступила 26.01.05

## GENERATION OF VACCINE STRAINS OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA WITH REDUCED ADVERSE REACTIONS

S.V. Dentsovskaya<sup>1</sup>, R.Z. Shaikhutdinova<sup>1</sup>, Yu.A. Knirel<sup>2</sup>, S.A. Ivanov<sup>1</sup>, A.P. Anisimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Research Center for Applied Microbiology, Obolensk, Moscow Region; <sup>2</sup> N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

The main shortcoming of the modern live and killed vaccines based on gram-negative bacterial strains is their ability to cause adverse reactions. The majority of the adverse reactions are associated with the effect of biological activity of lipopolysaccharide. The report covers the problems concerned with biogenesis of the lipid A, lipopolysaccharide structural component, responsible for its endotoxic activity, as well as with genes determining lipid A synthesis. The special attention is paid to gene-engineering technique for reduction of adverse reactions of vaccine strains that is based on knock-out mutagenesis of genes *waaM* and/or *waaN* responsible for addition of lauroyl and myristoyl residues to the distal glucosamine unit lipid A, generating acyloxyacyl moieties.