

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-17-26

УДК 616.9:579.61

А.С. Вагайская, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов

**Бактериальные тени возбудителей особо опасных инфекций**

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», р.п. Оболенск, Российская Федерация

Бактериальные тени представляют собой неповрежденные оболочки бактериальных клеток, которые освобождаются от своего содержимого через поры, сформированные с помощью мягких методов биологического или химического воздействия. Методология получения бактериальных теней повышает безопасность убитых вакцин, сохраняя при этом их антигенность за счет щадящих процедур приготовления. Более того, бактериальные тени могут быть одновременно носителями нескольких антигенов или плазмидных ДНК, кодирующих белковые эпитопы. В последние годы наблюдается рост интереса к разработке прототипов вакцин и систем доставки биологически активных веществ на основе бактериальных теней. В настоящем обзоре обсуждается прогресс в разработке данного типа препаратов за последние годы. Рассмотрены различные способы получения бактериальных теней, их преимущества и ограничения при использовании. Подробно описан лизис бактерий, опосредованный фагами, молекулярные манипуляции с генами лизиса, трудности, возникающие при масштабировании биотехнологического производства бактериальных теней, и пути их преодоления. Рассмотрено использование бактериальных теней в качестве альтернативных убитых вакцин, адъювантов, рекомбинантной антигенной платформы, носителя плазмидной ДНК на моделях возбудителей особо опасных инфекций бактериальной этиологии.

**Ключевые слова:** бактериальные тени, вакцины, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Brucella* spp., *Burkholderia* spp., *Bacillus anthracis*.

Корреспондирующий автор: Вагайская Анастасия Сергеевна, e-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com.

Для цитирования: Вагайская А.С., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Бактериальные тени возбудителей особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 1:17–26. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-17-26

Поступила 16.01.2023. Принята к публ. 09.03.2023.

A.S. Vagaiskaya, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov

**Bacterial Ghosts of the Causative Agents of Particularly Dangerous Infections**

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

**Abstract.** Bacterial ghosts are intact walls of bacterial cells that are relieved of their contents through pores formed by mild biological or chemical methods. Methodology for generating bacterial ghosts increases the safety of killed vaccines while maintaining their antigenicity through milder preparation procedures. Moreover, bacterial ghosts can simultaneously carry several antigens or plasmid DNAs encoding protein epitopes. In recent years, there has been a growing interest in the development of prototype vaccines and systems for delivery of biologically active substances based on bacterial ghosts. This review discusses the progress in the development of this type of medications over the last years. Various methods of obtaining bacterial ghosts, their advantages and limitations are considered. The phage-mediated lysis of bacteria, molecular manipulations with lysis genes, difficulties encountered in scaling the biotechnological production of bacterial ghosts, and ways to overcome them are described in detail. The use of bacterial ghosts as alternative killed vaccines, adjuvants, recombinant antigenic platform, carrier of plasmid DNA by the models of pathogens of particularly dangerous infections of bacterial etiology is investigated.

**Key words:** bacterial ghosts, vaccines, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Brucella* spp., *Burkholderia* spp., *Bacillus anthracis*.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anastasiya S. Vagaiskaya, e-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com.

Citation: Vagaiskaya A.S., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Bacterial Ghosts of the Causative Agents of Particularly Dangerous Infections. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 1:17–26. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-17-26

Received 16.01.2023. Accepted 09.03.2023.

Vagaiskaya A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7280-3660>

Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

Anisimov A.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5499-7999>

Известно, что суммарно на разработку одной современной вакцины уходит примерно 10–15 лет (базовые исследования – 2–4 года; доклинические испытания – до 2 лет; первая фаза клинического этапа – 1–5 лет; вторая фаза – 2–3 года; третья – 5 лет и более). Однако в ряде ситуаций допускается экстренный выпуск препаратов – вакцина проходит все необходимые этапы проверки в сокращенном варианте, как в случае вакцин для профилактики COVID-19

или лихорадки Эбола [1]. Два приведенных выше примера связаны с вирусными инфекциями, возбудители которых устроены гораздо проще, чем бактериальные патогены. Если у вирусов геном включает в среднем не более 10 генов, то у бактерий – уже несколько тысяч [2]. Соответственно различается и количество кодируемых ими белков.

Для ускорения процессов разработки и регистрации вакцинных препаратов предложена техно-

логия модульных вакцин (вакцинных платформ). Технология опирается на предварительно создаваемый «конструктор», включающий базовые носители (платформы) на основе прототипов уже известных патогенов и модульные антигены. Наличие таких заранее приготовленных наборов, чьи базовые носители и модульные антигены успешно прошли фазу II клинических испытаний, может ускорить разворачивание производства вакцин [3].

Комплексный подход к исследованиям повышает готовность здравоохранения к пандемиям за счет использования гибких модульных вакцин на основе прототипов патогенов, универсальных для целых групп родственных бактерий, обладающих перекрестно реагирующими антигенами [4]. Использование универсальных платформ способствует снижению стоимости и времени разработки вакцин [3].

Одним из наиболее перспективных базовых носителей в составе модульных вакцин являются бактериальные тени (Bacterial Ghost, BG). Классические BG представляют собой клеточные оболочки грамотрицательных бактерий, лишенные цитоплазматического содержимого, но сохранившие морфологию всех структур клеточной поверхности. Оригинальная технология получения бактериальных теней опирается на способность белка E бактериофага  $\phi$ X174 формировать трансмембранные туннельные структуры, пронизывающие внутреннюю и внешнюю мембраны бактерий. BG – инновационная система доставки вакцин, лекарств или биологически активных веществ. Структура частиц и свойства поверхности BG нацеливают их непосредственно на первичные антигенпрезентирующие клетки. Кроме того, BG обладают адьювантными свойствами и индуцируют усиленный гуморальный и клеточный иммунный ответ на антигены-мишени. Множественные антигены нативной оболочки BG и рекомбинантные белковые или ДНК-антигены могут быть объединены в одном типе BG. Антигены могут быть представлены на цитоплазматической или внешней мембране BG. Лекарства или протективные антигены также могут быть загружены во внутренний просвет или периплазматическое пространство BG. После отмывки BG могут храниться при комнатной температуре в виде лиофилизата. Рабочий цикл от посева производственной культуры до концентрата BG, готового к лиофилизации, не превышает суток, что соответствует критериям быстрого производства вакцин. Широкий спектр возможного применения в сочетании со сравнительно низкой себестоимостью производства делает платформу BG привлекательной технологией для конструирования вакцин и адресной доставки биологически активных веществ [5].

### Получение бактериальных теней

**Генно-инженерные методы.** Бактериофаги – одни из самых распространенных биологических

объектов, были впервые идентифицированы в начале XX в. [6]. Полиэдрические бактериофаги либо частично повреждают, либо полностью разрушают бактериальный пептидогликан для освобождения фагового потомства [7]. Двухцепочечные ДНК-фаги используют сложную систему лизиса – холин-эндолизинную систему. Простые одноцепочечные ДНК- или РНК-фаги лизируют клетки хозяина за счет ингибирования биосинтеза клеточной стенки всего одним лизирующим белком [7], что удобно для биотехнологических манипуляций. Вначале была исследована литическая активность гена *L* фага MS2 – первого секвенированного одноцепочечного РНК-фага. Позднее подробно изучен ген лизиса *E* первого секвенированного одноцепочечного ДНК-фага  $\phi$ X174. Оба бактериофага с литическим жизненным циклом способны инфицировать широкий спектр представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Белок E фага  $\phi$ X174 – гидрофобный белок, который локально нарушает синтез пептидогликана бактерий за счет ингибирования активности фермента фосфо-N-ацетилмурамоил-пентапептидной транслоказы (MraY) [8]. Лизис, опосредованный белком E, осуществляется путем слияния внутренней и внешней мембран, ведущего в активно растущих клетках к образованию трансмембранного туннеля от 40 до 400 нм в диаметре, расположенного на экваторе или на полюсах клеток [9]. Под действием осмотического давления через образовавшуюся пору бактериальная клетка освобождается от содержимого, сохраняя при этом исходную форму.

Для обеспечения регулируемого лизирующего эффекта гены лизиса клонируют в плазмидном векторе, содержащем для обеспечения стабильности наследования маркер – ген устойчивости к антибиотикам [9] или ген аспартатполухальдегиддегидрогеназы (*asd*) [10]. Эффективность лизиса зависит от экспрессирующей кассеты, которая включает промоторную область, управляющую транскрипцией гена лизиса, и его репрессор [11]. Индукцию лизиса клеток обычно начинают в средней или поздней фазе экспоненциального роста бактериальной культуры и контролируют путем измерения ее оптической плотности. Наиболее распространенной регуляторной системой является кассета экспрессии с термоиндуцибельным промотором pL/pR фага  $\lambda$  [12] и термочувствительным репрессором cI857, предотвращающим экспрессию при температурах ниже 37 °C [13]. Полученные бактериальные тени подвергают лиофилизации, после чего они могут храниться при комнатной температуре на протяжении нескольких лет [14].

Для получения BG используют и другие литические гены. BG *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* и *Pseudomonas stephensi* были получены путем передачи в них плазмиды pDKL02, кодирующей литические гены *S* (холин), *R* (эндолизин) и *Rz* (спанин) бактериофага  $\lambda$  [15]. W. Zhu *et al.* [16] при получении BG *E. coli* повысили литическую эффективность до 99,99 % на логарифмической стадии

роста путем конструирования литической плазмиды (mE-L-SNA), кодирующей синтез белка E, слитого со стафилококковой нуклеазой A (SNUC). Q. Tian *et al.* [17] получили BG *Streptococcus pullorum* путем слияния гена антимикробного пептида SMAP29 с литическим геном E бактериофага  $\phi$ X174. Через 24 ч после индукции лизиса жизнеспособные бактерии в препарате BG не были обнаружены. Для получения BG *Yersinia pestis* была использована литическая способность холин-эндолизиновой системы чумного диагностического бактериофага Л-413С [18].

Стремление разработать безопасные BG на основе грамположительных микроорганизмов инициировало исследования по поиску новых фагов с новыми лизирующими генами. Вирулентный фаг Lcb против *Lactobacillus casei* ATCC 393 выделен из ферментированных овощей [19]. Показано, что продукт гена холина (*Hocb*) данного фага способен успешно проникать в клетки *L. casei* [20].

Снижение эффективности лизиса при крупномасштабном производстве бактериальных теней является ключевым препятствием для полной гарантии отсутствия в препарате жизнеспособных клеток [21, 22]. Введение мутации в литический ген белка E (mE) для корректировки рабочих условий [12, 21], использование новых литических генов холин-эндолизиновой системы [23], добавление дополнительных генов нуклеаз к литическим кассетам [13, 24, 25] или включение в их состав генов противомикробных пептидов [17, 26], применение антибиотиков на этапах отмывки препаратов [26, 27], лиофилизация BG для уничтожения всех жизнеспособных клеток [28] применяются для улучшения результатов лизиса и обеспечения высоких выходов безопасного конечного продукта.

**Химические методы.** В качестве подхода к созданию BG применяют несколько щадящих методов химической обработки для образования пор в стенке микробной клетки. Использование химических методов позволяет устранить опасения, связанные с использованием векторных плазмид, которые могут нести гены возможных факторов патогенности или гены устойчивости к антибиотикам [29].

«Губчатый» метод является наиболее часто используемым химическим процессом приготовления BG, в котором с помощью химических реагентов создаются поры в клеточной оболочке бактерий и клеточное содержимое удаляют путем центрифугирования. A.A. Amara *et al.* [30] разработали протокол получения бактериальных теней *E. coli* с использованием субингибирующих концентраций NaOH, ДСН, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и CaCO<sub>3</sub>. S.A. Sheweta *et al.* [31] приготовили «губчатые» BG путем инкубации *Acinetobacter baumannii* Ali190 в смеси NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и в растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. S. Rabea *et al.* [32] создали новый химический метод приготовления BG, выращивая штамм *Salmonella enterica* serovar Typhimurium в течение 24 ч в питательной среде с добавлением 7 % Tween 80, затем pH среды снижали на 1 ч до 3,6 до-

бавлением молочной кислоты. Tween 80 вызывал растворение гидрофобных компонентов внешней мембраны бактерии, что облегчало образование пор, вызванное внезапным снижением pH. В другом биохимическом методе BG были созданы путем инкубации бактерий в искусственном синтетическом амфифильном пептиде (MAP) [33]. Кроме того, для получения BG *Actinobacillus pleuropneumoniae* использовали антимикробный пептид *Limulus* наряду с высоким гидростатическим давлением [34]. Свиной миелоидный противомикробный пептид (PMPA36) применили для получения BG *Brucella abortus* [35], лизоцим использовали для получения BG *Bacillus stearothermophilus* [36], а слитый белок PMPA36-лизоцим – для BG *Salmonella* Typhimurium [37]. Протокол обработки NaOH-МІС в сочетании с пенициллином/стрептолизинотом используют для получения BG *Streptococcus agalactiae* [38] или в сочетании с HCl – для получения BG *Bacillus* spp. [39].

Химический процесс получения BG может проводиться на любой стадии роста бактерий и требует только разбавления культуры до ОП<sub>600</sub>=0,1. Кроме того, химический метод получения бактериальных теней не ограничивается только грамотрицательными бактериями, поскольку он также эффективен для грамположительных бактерий и дрожжей [40]. Химический метод прост, быстр и не изменяет трехмерную морфологию клеток, за исключением образования отверстий. Однако химические вещества могут денатурировать поверхностные антигены. Лишние отверстия могут нарушить свойство контролируемого высвобождения внутриклеточного содержимого. Таким образом, методы генной инженерии по-прежнему являются наиболее широко используемыми методами получения бактериальных теней.

### Бактериальные тени возбудителей особо опасных инфекций

***Escherichia coli*.** STEC (Shiga-toxin producing *E. coli*) – штаммы, вызывающие ГУС (гемолитико-уремический синдром). Классическая технология конструирования бактериальных теней с помощью гена литического белка E фага  $\phi$ X174 разработана и детально исследована в конце 1980-х гг. в Венском университете группой W. Lubitz на лабораторных штаммах *E. coli*. Вспышка в 2011 г. в Германии токсикоинфекций, вызванных STEC O104:H4, и установление того, что заболеваемость ГУС в мире составляет от 0,2 до 4,28 на 100 тыс. детского населения в год, а летальность в острый период колеблется от 2,5 до 12 % [41], возобновили интерес к конструированию эшерихиозных BG-вакцин, но преимущественно против Шига-токсин-продуцирующих штаммов *E. coli*, отнесенных ко II группе патогенности.

В нескольких сериях экспериментов было показано, что введение мышам BG энтерогеморрагической *E. coli* O157:H7 двукратно алиментарно [42], однократно ректально [43], однократно внутрибрю-



шинно [44] или телятам, как основному резервуару возбудителя, путем двукратной подкожной инъекции [45] индуцировало клеточный и гуморальный иммунный ответ и обеспечивало защиту иммунизированных животных от алиментарного заражения гетерологичными серотипами кишечной палочки.

BG штамма *E. coli*, экспрессирующего два иммунологически различных варианта Шига-анатоксина, успешно индуцировали антитоксинальную и антиадгезионную иммунную защиту у мышей против энтерогеморрагической *E. coli* O157:H7 [46]. Другие исследователи в качестве антитоксина использовали BG *E. coli*, одновременно экспрессирующей Gb3-рецепторы к Шига-токсинам Stx1 и Stx2 [47]. BG *E. coli* O157:H7, экспрессирующей VP1-антиген вируса ящура, защищали мышей и их детенышей от инфекции, вызванной *E. coli* O157:H7, и вирусного заболевания [48].

BG *E. coli* O78:K80, несущие внешний домен матричного белка 2 и гены нуклеопротеина вируса птичьего гриппа, а также иммунодоминантные эпитопы генов гибридного белка и гемагглютинин-нейраминидазы вируса болезни Ньюкасла, индуцируют активацию врожденного и приобретенного иммунитета против вирусов и патогенной кишечной палочки [49]. Оральное введение BG *E. coli*, содержащих плазмидную ДНК, кодирующую эпитопы OmpU и VMH *Vibrio mimicus*, вызывало защитный иммунный ответ [50]. При создании противораковых вакцин установлено, что бактериальные тени *E. coli*, применяемые отдельно [51] или заполненные лизатом опухоли [52], индуцировали более сильную активацию и созревание дендритных клеток, чем липополисахариды.

***Vibrio cholerae*.** Другим наиболее исследованным с середины 1990-х гг. в университете Вены бактериальным видом для производства BG являются *Vibrio cholerae* (II группа патогенности). Установлено, что бактериальные тени холерного вибриона, продуцируемые при экспрессии клонированного гена лизиса *E* бактериофага  $\phi$ X174, обладают адъювантными свойствами и являются иммуногенными. Мыши, иммунизированные внутрибрюшинно BG *V. cholerae* (O1), показали более высокий уровень вибриоспецифических сывороточных IgG и вибриоцидных антител, чем после введения инактивированных нагреванием холерных вирионов [53]. Хотя гетерологичный иммунитет возникал у кроликов только при подкожном введении BG *V. cholerae* (O139), продуцирующим токсин-корегулируемые пили [54], оральный путь иммунизации обеспечивал одинаковый иммунитет независимо от того, были у бактерии пили или нет [55].

В 1994 г. Фрэнсис Эко, исследователь из Венского университета, инициировал использование BG *V. cholerae* в качестве платформы для экспрессии гетерологичных генов [56]. Несколько лет спустя в Медицинской школе Морхаус в Атланте (Джорджия, США) начались успешные исследования по исполь-

зованию BG холерного вибриона для экспрессии антигенов *Chlamydia* spp. [57].

***Brucella* spp.** Бруцеллез, вызываемый патогенными представителями *Brucella* spp. (II группа патогенности), является важным зоонозным инфекционным заболеванием, которое представляет значительную угрозу для здоровья и безопасности населения. Существующие противобруцеллезные вакцины имеют ряд недостатков, включая высокую остаточную вирулентность для животных и людей. Альтернативным подходом в разработке вакцин против бруцеллеза является разработка BG с использованием литических продуктов бактериофагов или антимикробных пептидов млекопитающих.

Как и формол-инактивированный препарат бруцелл, BG *Brucella suis* S2, полученные путем литического действия белка E бактериофага  $\phi$ X174, ген которого был расположен на введенной в штамм плазмиде, обладают способностью индуцировать патоген-специфический антительный ответ, повышать CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеточный иммунный ответ, стимулировать секрецию  $\gamma$ -интерферона (IFN- $\gamma$ ) и интерлейкина-4 (IL-4) и обеспечивают уровни защиты мышей от заражения *Brucella melitensis* 16M, как и живая вакцина на основе аттенуированного штамма *B. suis* [58].

J. Qian *et al.* [59] путем гомологичной рекомбинации интегрировали литический ген E в хромосому штамма *Brucella canis* RM6/66, создав генетически стабильный штамм, не несущий гена лекарственной устойчивости. Полученные BG показали гарантированную безопасность и иммуногенность, сравнимую с живой вакциной. Ген, кодирующий бактериальный белок B0419, был делетирован в вакцинном штамме *B. canis* RM6/66, что может явиться молекулярной меткой при дифференциации инфекционного и вакцинного процессов с помощью ИФА. Созданный препарат BG обеспечивал защиту вакцинированных мышей от *B. canis* RM6/66 и *B. melitensis* 16M.

Подобный подход, основанный на делеции гена хромосомной локализации и введения на его место литической кассеты, был использован с целью создания BG *Brucella abortus* 2308 $\Delta$ gntR [60]. Авторы показали безопасность BG *B. abortus* 2308 $\Delta$ gntR для мышей линии BALB/c. Введение BG *B. abortus* 2308 $\Delta$ gntR индуцировало продукцию специфических иммуноглобулинов G (IgG) и секрецию  $\gamma$ -интерферона и интерлейкина-4. Кроме того, BG *B. abortus* 2308 $\Delta$ gntR индуцировали сильный ответ CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток селезенки. Иммунизация стимулировала высокий защитный иммунитет у мышей BALB/c против заражения штаммом *B. abortus* S2308.

Однако бактериальные клетки могут быть не полностью инактивированы путем биологического лизиса, что создает риск, связанный с вакцинацией. C. He *et al.* [61] создали BG штамма *B. abortus* A19 (BGA19) с помощью стратегии двойной инактивации с биологическим лизисом, опосредованным

белком Е бактериофага  $\phi$ X174, и последующей обработкой перекисью водорода, что обеспечивало 100%-ную инактивацию бруцелл, так что жизнеспособные бактериальные клетки не были обнаружены даже при сверхвысокой концентрации  $10^{10}$  КОЕ/мл. BG A19 обладали типичной морфологией BG, хорошей генетической стабильностью, не вызывали побочных реакций у морских свинок. Уровни антител, интерферона- $\gamma$ , интерлейкина-4 и CD4<sup>+</sup> Т-клеток у морских свинок, привитых вакциной A19BG, были аналогичны уровням у животных, привитых живым аттенуированным вакцинным штаммом A19. Иммунизация BG A19 обеспечивала такой же уровень защиты, как и A19, от *B. melitensis* M28 как у морских свинок, так и у крупного рогатого скота. В заключение отметим, что комбинация биологического лизиса и инактивации, опосредованной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, является безопасной и эффективной стратегией, которая может служить эталоном для приготовления вакцин BG.

Антимикробные пептиды (АМП) являются компонентом врожденной иммунной системы. Механизм действия АМП заключается в нарушении барьерной функции мембраны путем образования пор или индукции проницаемости мембраны без нарушения целостности мембраны [62]. Кроме того, известно, что некоторые АМП действуют как адъюванты [63]. Свиной миелоидный антимикробный пептид-36 (Porcine myeloid antimicrobial peptide-36 – PMAP-36) обладает самым высоким положительным зарядом среди АМП, обнаруженных у свиней [64]. N-концевой  $\alpha$ -спиральный домен PMAP-36 состоит из 24 аминокислот (GI24) и может также проникать через бактериальную мембрану, как и полный 36-аминокислотный белок PMAP-36 [65].

A.J. Kwon *et al.* [35] впервые использовали фрагмент PMAP-36, названный GI24, для лизиса клеток и получения BG *B. abortus*. Мыши, внутрибрюшинно иммунизированные BG *B. abortus*, продуцировали значительное количество сывороточных IgG и цитокинов (TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ), связанных с иммунным ответом типа Th1. Кроме того, иммунизированные внутрибрюшинно мыши были достоверно защищены от системной инфекции при заражении вирулентным штаммом бруцелл *B. abortus* 544. Позднее была показана протективность клеток *B. abortus*, лизированных с помощью GI24, для иммунизированных подожно биглей [66] и черных корейских коз [67].

Для получения BG B. Sumathi *et al.* [68] лизировали клетки вакцинного штамма *B. melitensis* Rev 1 и дикого штамма *B. melitensis* ( $3,0 \cdot 10^9$  КОЕ/мл) с использованием свиного кателицидина GI24 из расчета 80 мкг/мл. Формирование BG подтверждали отсутствием роста бруцелл на селективном агаре, отсутствием амплификации фрагмента размером 731 п.н. в AMOS-ПЦР и морфологическими изменениями клеток, включая образование туннелей при сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Две BG-вакцины и стандартную вакцину Rev 1

вводили внутрибрюшинно мышам, оценивая гуморальный иммунный ответ путем количественного определения уровней IgG в сыворотке и клеточно-опосредованный иммунный ответ с помощью анализа пролиферации лимфоцитов и определения профиля Th2 (IL-4, IL-10) и Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) цитокинов. Вакцинный штамм *B. melitensis* Rev 1 имел незначительное преимущество перед двумя вариантами BG по индукции иммунного ответа, но BG оказались более безопасны и обеспечили сопоставимый уровень защиты вакцинированных мышей после заражения вирулентным штаммом *B. melitensis* 16M.

***Yersinia pestis.*** Чума – зоонозная бактериальная инфекция, вызываемая *Y. pestis* (I группа патогенности), унесла более 200 млн человеческих жизней. За чуть более 100 лет с момента открытия ее этиологического агента предпринято несколько попыток разработать эффективную вакцину против чумы. Классические убитые и живые чумные вакцины первого поколения спасли десятки миллионов людей, но убитые неэффективны против легочной чумы, а живые могут вызвать у лиц с нарушениями иммунного статуса или метаболическими нарушениями генерализованный инфекционный процесс с летальным исходом. Субъединичные вакцины на основе одного или двух иммунодоминантных антигенов (F1 и/или V) чумного микроба не защищают от заболевания, вызванного штаммами, лишенными F1 и/или продуцирующими слабо перекрестно реагирующие изоформы V антигена [69]. Кроме того, обеспечивая 100 % защиту мышей субъединичные вакцины защищают от болезни лишь часть более близких к человеку по иммунному ответу морских свинок и обезьян. В свою очередь нерастворимый в воде «остаточный» антиген из клеточных стенок *Y. pestis* стимулирует Т-клеточный иммунный ответ, обеспечивающий надежную защиту от инфекции морских свинок и обезьян, но не эффективный в отношении мышей [70].

BG на основе *Y. pestis* были получены путем использования комбинации генов, кодирующих лизис-опосредующий белок Е бактериофага  $\phi$ X174 и/или холин-эндолизинные системы фагов  $\lambda$  или чумного диагностического бактериофага Л-413С. Экспрессия гена белка Е приводила к формированию BG, которые сохраняли форму исходной бактерии. Одновременная экспрессия гена белка Е с генами, кодирующими холин-эндолизинную систему фага Л-413С, вызывала образование структур, напоминающих коллапсированные (схлопнувшиеся) мешочки. Такие структуры, утратившие свою жесткость, также образовались в результате экспрессии только генов холин-эндолизина фага Л-413С. Аналогичная холин-эндолизинная система из фага  $\lambda$ , содержащего мутацию в гене холина S и интактные гены R-Rz, кодирующие эндолизины, приводила к образованию смесей BG как сохранивших, так и полностью утративших исходную форму, определяемую пептидогликановым каркасом. Добавление протеина Е к работе этой системы смещало равновесие в смеси в сторону

спавшихся мешочков. Утрату жесткости структуры BG можно объяснить полным лизисом пептидогликанового скелета. Иммунизация лабораторных животных вариантами BG с последующим заражением штаммом *Y. pestis* дикого типа показала, что бактериальные оболочки защищали только морских свинок. BG с максимально гидролизированным пептидогликаном обладали большей протективностью по сравнению с BG с сохраненным пептидогликановым скелетом [18].

#### ***Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*.**

Род *Burkholderia* включает три вида: *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. cepacia*, – вызывающих смертельные заболевания людей. *B. pseudomallei* и *B. mallei* – возбудители мелиоидоза и сапа соответственно, а заражение *B. cepacia* приводит к летальному исходу у пациентов с муковисцидозом. Из-за высокого уровня инфекционности и устойчивости ко многим широко используемым антибиотикам, а также высокой летальности *B. mallei* и *B. pseudomallei* относят ко II группе патогенности. Лечение заболеваний, вызванных этими бактериями, часто безуспешно с частыми рецидивами инфекции. В настоящее время не существует эффективных вакцин для предотвращения инфекций, вызываемых *Burkholderia* spp. [71]. Несмотря на сообщения о способности нескольких вакцин против буркгольдерии обеспечивать определенную иммунопротективность, ни одна из вакцин не достигла стадии клинических испытаний, что указывает на серьезные трудности, существующие при разработке безопасных вакцин против инфекций, вызванных данными возбудителями [71]. Обнаружение ряда литических бактериофагов *Burkholderia* [72] дает надежду на возможность создания BG патогенов данного рода в качестве инструментов для разработки убитых цельноклеточных вакцин.

***Bacillus anthracis*.** До настоящего времени нет сообщений о получении BG грамположительной бактерии *B. anthracis* (II группа патогенности). Экспрессия белка Е в грамположительных бактериях приводит к гибели клеток без лизиса, поскольку образование BG зависит от слияния внутренней и внешней мембран, что происходит только у грамотрицательных бактерий [73]. Однако бактериальные тени *B. anthracis* можно попытаться получить химическим методом, успешно опробованным на других грамположительных патогенах [36, 38, 39, 74].

Без сомнения, вакцины на основе BG демонстрируют явное превосходство над убитыми вакцинами. Этот метод продемонстрировал свою пригодность для приготовления альтернативно-убитых рекомбинантных, ДНК- и бактериально-теневого вакцин, а также адъювантов, антитов, терапевтических и клеточных прототипов вакцин. BG обладают замечательной адъювантностью при нескольких способах доставки. Они улучшают эффективность ДНК вакцин, лизатов опухолевых клеток. BG специфически доставляют собственные или включенные в их состав антигены к антигенпрезентирующим клеткам, что

индуцирует формирование напряженного и сбалансированного клеточного (Th1) и гуморального (Th2) иммунитета даже при низких концентрациях антигена или однократной иммунизации, особенно при введении через слизистую оболочку. Аэрозольная иммунизация BG показала свою эффективность в качестве метода массовой иммунизации. В отличие от традиционных способов наработки рекомбинантных белков, формирование BG сопровождается правильным фолдингом, обеспечивающим нативную конформацию трехмерной структуры экспрессируемых белков [75].

Использование химического способа при производстве бактериальных теней все еще имеет некоторые ограничения. Это связано с тем, что даже мягкий химический лизис способен изменять конфигурацию поверхностных антигенов бактерий. Более того, образование капсул или экзополисахаридов некоторыми видами бактерий или даже присутствие бактериальных клеток с разными фазами роста в одной и той же культуре может сделать результат процесса химического гидролиза переменным и труднопроизводимым. Это означает, что в одной и той же микробной культуре химический процесс может чрезмерно воздействовать на одни клетки и полностью разрушать их, в то время как другие клетки остаются жизнеспособными.

С биотехнологической точки зрения идеальная BG вакцина должна: 1) содержать нативные целевые иммунодоминантные антигены; 2) отвечать требованиям биологической безопасности; 3) быть технологичной в плане рациональной продолжительности рабочего цикла, используемых химических веществ и необходимых этапов очистки; 4) обеспечивать в процессе наработки высокую плотность биомассы и 5) обладать стабильностью конечного продукта. С точки зрения биобезопасности технология получения BG должна: 1) гарантировать полное уничтожение жизнеспособных клеток штамма-продуцента; 2) эффективно работать в культурах с высокой плотностью; 3) быть независимой от использования антибиотиков для любых целей во время производства; 4) удалять остаточные количества нуклеиновых кислот; 5) использовать для наработки BG безопасные производственные культуры бактерий, не обладающие перекрестными реакциями с антигенами хозяина и/или микробиомом человека.

Для обеспечения уверенного выхода BG на рынок медицинских препаратов необходимо: 1) расширить спектр фагов – источников лизирующих генов, – комбинации которых обеспечат полную утрату жизнеспособности продуцентов BG и удаление бактериальных нуклеиновых кислот; 2) найти и охарактеризовать новые продукты, которые могут лизировать грамположительные бактерии и грибы; 3) подобрать несколько универсальных для отдельных филогенетических групп носителей на основе безопасных грамотрицательных бактерий, которые имеют высокую скорость наработки, эффективно



лизируются, доставляют целевой антиген к антиген-презентирующим клеткам и выступают в качестве адъювантов.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

*Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».*

## Список литературы

1. Вакцины: путь от изобретения до применения. [Электронный ресурс]. URL: <https://asko-med.ru/blog/vaktsiny/vaktsiny-put-ot-izobreteniya-do-primeneniya/> (дата обращения 28.12.2022).
2. Сравнение размеров геномов вируса, бактерии и млекопитающего. [Электронный ресурс]. URL: <https://kodomo.fbb.msu.ru/~nataliya.kashko/term1/comparison/index.html> (дата обращения 28.12.2022).
3. Charlton Hume H.K., Lua L.H.L. Platform technologies for modern vaccine manufacturing. *Vaccine*. 2017; 35(35 Pt. A):4480–5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.02.069.
4. Monrad J.T., Sandbrink J.B., Cherian N.G. Promoting versatile vaccine development for emerging pandemics. *NPJ Vaccines*. 2021; 6(1):26. DOI: 10.1038/s41541-021-00290-y.
5. Langemann T., Koller V.J., Muhammad A., Kudela P., Mayr U.B., Lubitz W. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng. Bugs*. 2010; 1(5):326–36. DOI: 10.4161/bbug.1.5.12540.
6. Haq I.U., Chaudhry W.N., Akhtar M.N., Andleeb S., Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol. J.* 2012; 9(1):9. DOI: 10.1186/1743-422X-9-9.
7. Young I., Wang I., Roof W.D. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* 2000; 8(3):120–8. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01705-4.
8. Mendel S., Holbourn J.M., Schouten J.A., Bugg T.D.H. Interaction of the transmembrane domain of lysis protein E from bacteriophage  $\phi$ X174 with bacterial translocase MraY and peptidyl-prolyl isomerase SlyD. *Microbiology*. 2006; 152(10):2959–67. DOI: 10.1099/mic.0.28776-0.
9. Witte A., Wanner G., Sulzner M., Lubitz W. Dynamics of  $\phi$ X174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 1992; 157(4):381–8. DOI: 10.1007/BF00248685.
10. Nakayama K., Kelly S.M., Curtiss R. Construction of an ASD+ expression-cloning vector: Stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Nat. Biotechnol.* 1988; 6(6):693–7. DOI: 10.1038/nbt0688-693.
11. Szostak M.P., Hensel A., Eko F.O., Klein R., Auer T., Mader H., Haslberger A., Bunka S., Wanner G., Lubitz W. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. *J. Biotechnol.* 1996; 44(1-3):161–70. DOI: 10.1016/0168-1656(95)00123-9.
12. Jechlinger W., Szostak M.P., Witte A., Lubitz W. Altered temperature induction sensitivity of the lambda pR/cI857 system for controlled gene E expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 173(2):347–52. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13524.x.
13. Fu L., Lu C. A novel dual vector coexpressing  $\phi$ X174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene on the basis of Lambda promoter pR and pL, respectively. *Mol. Biotechnol.* 2013; 54(2):436–44. DOI: 10.1007/s12033-012-9581-0.
14. Paukner S., Stiedl T., Kudela P., Bizik J., Al Laham F., Lubitz W. Bacterial ghosts as a novel advanced targeting system for drug and DNA delivery. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2006; 3(1):11–22. DOI: 10.1517/17425247.3.1.11.
15. Kloos D.U., Strätz M., Güttler A., Steffan R.J., Timmis K.N. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. *J. Bacteriol.* 1994; 176(23):7352–61. DOI: 10.1128/jb.176.23.7352-7361.1994.
16. Zhu W., Zhang Y., Liu X. Efficient production of safety-enhanced *Escherichia coli* ghosts by tandem expression of  $\phi$ X174 mutant gene E and staphylococcal nuclease A gene. *Microbiol. Res.* 2015; 176:7–13. DOI: 10.1016/j.micres.2015.03.011.
17. Tian Q., Zhou W., Si W., Yi F., Hua X., Yue M., Chen L., Liu S., Yu S. Construction of *Salmonella pullorum* ghost by co-expression of lysis gene E and the antimicrobial peptide SMAP29 and evaluation of its immune efficacy in specific-pathogen-free chicks. *J. Integr. Agric.* 2018; 17(1):197–209. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61696-4.
18. Dentovskaya S.V., Vagaishkaya A.S., Platonov M.E., Trunyakova A.S., Kotov S.A., Krasil'nikova E.A., Titareva G.M., Mazurina E.M., Gape'chenkova T.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Kombarova T.I., Gerasimov V.N., Uversky V.N., Anisimov A.P. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection. *Vaccines (Basel)*. 2021; 10(1):51. DOI: 10.3390/vaccines10010051.
19. Zhang X., Lan Y., Jiao W., Li Y., Tang L., Jiang Y., Cui W., Qiao X. Isolation and characterization of a novel virulent phage of *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Food Environ. Virol.* 2015; 7(4):333–41. DOI: 10.1007/s12560-015-9206-4.
20. Hou R., Li M., Tang T., Wang R., Li Y., Xu Y., Tang L., Wang L., Liu M., Jiang Y., Cui W., Qiao X. Construction of *Lactobacillus casei* ghosts by Holin-mediated inactivation and the potential as a safe and effective vehicle for the delivery of DNA vaccines. *BMC Microbiol.* 2018; 18(1):80. DOI: 10.1186/s12866-018-1216-6.
21. Yu S.Y., Peng W., Si W., Yin L., Liu S.G., Liu H.F., Zhao H.L., Wang C.L., Chang Y.H., Lin Y.Z. Enhancement of bacteriolysis of shuffled phage  $\phi$ X174 gene E. *Virol. J.* 2011; 8:206. DOI: 10.1186/1743-422X-8-206.
22. Haidinger W., Szostak M.P., Beisker W., Lubitz W. Green fluorescent protein (GFP)-dependent separation of bacterial ghosts from intact cells by FACS. *Cytometry*. 2001; 44(2):106–12.
23. Won G., Kim B., Lee J.H. A novel method to generate *Salmonella* Typhi Ty21a ghosts exploiting the  $\lambda$  phage holin-endolysin system. *Oncotarget*. 2017; 8(29):48186–95. DOI: 10.18632/oncotarget.18383.
24. Kwon S.R., Kang Y.J., Lee D.J., Lee E.H., Nam Y.K., Kim S.K., Kim K.H. Generation of *Vibrio anguillarum* ghost by coexpression of  $\phi$ X174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene. *Mol. Biotechnol.* 2009; 42(2):154–9. DOI: 10.1007/s12033-009-9147-y.
25. Zhang C., Zhao Z., Li J., Song K.G., Hao K., Wang J., Zhu B. Bacterial ghost as delivery vehicles loaded with DNA vaccine induce significant and specific immune responses in common carp against spring viremia of carp virus. *Aquaculture*. 2019; 504:361–8. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.021.
26. Kudela P., Paukner S., Mayr U.B., Cholujova D., Schwarczova Z., Sedlak J., Bizik J., Lubitz W. Bacterial ghosts as novel efficient targeting vehicles for DNA delivery to the human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunother.* 2005; 28(2):136–43. DOI: 10.1097/01.cji.0000154246.89630.6f.
27. Lv M., Qin Z., Yu J., Yuan J., Sun M., Wu C., Cai J. Immunogenicity of bacterial ghosts from *Escherichia coli* O78 isolated from ducklings. *Zhongguo Yufang Shouyi Xuebao / Chin. J. Prev. Vet. Med.* 2010; 32(9):712–5.
28. Ran X., Meng X.Z., Geng H.L., Chang C., Chen X., Wen X., Ni H. Generation of porcine *Pasteurella multocida* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in mice. *Microb. Pathog.* 2019; 132:208–14. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.04.016.
29. Amara A.A., Neama A.J., Hussein A., Hashish E.A., Sheweita S.A. Evaluation of the surface antigen of the *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ghosts prepared by “SLRP”. *Sci. World J.* 2014; 2014:840863. DOI: 10.1155/2014/840863.
30. Amara A.A., Salem-Bekhit M.M., Alanazi F.K. Sponge-like: a new protocol for preparing bacterial ghosts. *Sci. World J.* 2013; 2013:545741. DOI: 10.1155/2013/545741.
31. Sheweita S.A., Batah A.M., Ghazy A.A., Hussein A., Amara A.A. A new strain of *Acinetobacter baumannii* and characterization of its ghost as a candidate vaccine. *J. Infect. Public Health*. 2019; 12(6):831–42. DOI: 10.1016/j.jiph.2019.05.009.
32. Rabea S., Salem-Bekhit M.M., Alanazi F.K., Yassin A.S., Moneib N.A., Hashem A.E.M. A novel protocol for bacterial ghosts' preparation using tween 80. *Saudi Pharm. J.* 2018; 26(2):232–7. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.12.006.
33. Palm-Apergi C., Hällbrink M. A new rapid cell-penetrating peptide based strategy to produce bacterial ghosts for plasmid delivery. *J. Control. Release*. 2008; 132(1):49–54. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.08.011.
34. Li L., Lei L., Zhang S., Han W., Wang W. Preparation and experimental immunity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghost vaccine. *Chin. J. Vet. Sci.* 2012; 32(10):1461–7.
35. Kwon A.J., Moon J.Y., Kim W.K., Kim S., Hur J. Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (GI24) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models. *J. Vet. Med. Sci.* 2016; 78(10):1541–8. DOI: 10.1292/jvms.16-0036.
36. Amara A.A. The critical activity for the cell wall degrading enzymes: Could the use of the lysozyme for Microbial Ghosts preparation establish emergence oral vaccination protocol? *Int. Sci. Invest. J.* 2016; 5(2):351–69.
37. Moon J.Y., Kim S.Y., Kim W.K., Rao Z., Park J.H., Mun J.Y., Kim B., Choi H.S., Hur J. Protective efficacy of a *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine candidate constructed with a recombi-

- nant lysozyme-PMAP36 fusion protein in a murine model. *Can. J. Vet. Res.* 2017; 81(4):297–303.
38. Wang Q., Wang X., Wang X., Feng R., Luo Q., Huang J. Generation of a novel *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia. *Fish Shellfish Immunol.* 2018; 81:49–56. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.055.
39. Choi C.W., Ji S.M., Park H.J., Oh S., Vinod N., No H.B. Method of preparing bacterial ghosts from gram-positive bacteria by hydrochloric acid treatment. US11,066,638B2. *US Patent App.* 2021-07-20.
40. Vinod N., Oh S., Park H.J., Koo J.M., Choi C.W., Kim S.C. Generation of a novel *Staphylococcus aureus* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in rats. *Infect. Immun.* 2015; 83(7):2957–65. DOI: 10.1128/IAI.00009-15.
41. Эмирова Х.М., Толстова Е.М., Коган М.Ю., Орлова О.М., Абасеева Т.Ю., Панкратенко Т.Е., Шпикалова И.Ю. Гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шига-токсин-продуцирующей *Escherichia coli*. *Нефрология.* 2016; 20(2):18–32.
42. Cai K., Gao X., Li T., Hou X., Wang Q., Liu H., Xiao L., Tu W., Liu Y., Shi J., Wang H. Intragastric immunization of mice with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts reduces mortality and shedding and induces a Th2-type dominated mixed immune response. *Can. J. Microbiol.* 2010; 56(5):389–98. DOI: 10.1139/w10-025.
43. Mayr U.B., Kudela P., Atrasheuskaya A., Bukin E., Ignatyev G., Lubitz W. Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. *Microb. Biotechnol.* 2012; 5(2):283–94. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00316.x.
44. Ran X., Chen X., Wang S., Chang C., Wen X., Zhai J., Ni H. Preparation of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) ghosts and immunogenic analysis in a mouse model. *Microb. Pathog.* 2019; 126:224–30. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.015.
45. Vilte D.A., Larzábal M., Mayr U.B., Garbaccio S., Gammella M., Rabinovitz B.C., Delgado F., Meikle V., Cantet R.J., Lubitz P., Lubitz W., Cataldi A., Mercado E.C. A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157:H7 in calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2012; 146(2):169–76. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.03.002.
46. Cai K., Tu W., Liu Y., Li T., Wang H. Novel fusion antigen displayed-bacterial ghosts vaccine candidate against infection of *Escherichia coli* O157:H7. *Sci. Rep.* 2015; 5:17479. DOI: 10.1038/srep17479.
47. Paton A.W., Chen A.Y., Wang H., McAllister L.J., Höggerl F., Mayr U.B., Shewell L.K., Jennings M.P., Morona R., Lubitz W., Paton J.C. Protection against Shiga-toxinigenic *Escherichia coli* by non-genetically modified organism receptor mimic bacterial ghosts. *Infect. Immun.* 2015; 83(9):3526–33. DOI: 10.1128/IAI.00669-15.
48. Gong S., Nan N., Sun Y., He Z., Li J., Chen F., Li T., Ning N., Wang J., Li Z., Luo D., Wang H. Protective immunity elicited by VP1 Chimeric antigens of bacterial ghosts against hand-foot-and-mouth disease virus. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(1):61. DOI: 10.3390/vaccines8010061.
49. Lagzian M., Bassami M.R., Dehghani H. *In vitro* responses of chicken macrophage-like monocytes following exposure to pathogenic and non-pathogenic *E. coli* ghosts loaded with a rational design of conserved genetic materials of influenza and Newcastle disease viruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 176:5–17. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.05.005.
50. Cao J., Zhu X.C., Liu X.Y., Yuan K., Zhang J.J., Gao H.H., Li J.N. An oral double-targeted DNA vaccine induces systemic and intestinal mucosal immune responses and confers high protection against *Vibrio mimicus* in grass carps. *Aquaculture.* 2019; 504:248–59. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.006.
51. Hajam I.A., Dar P.A., Appavoo E., Kishore S., Bhanuprakash V., Ganesh K. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One.* 2015; 10(12):e0144397. DOI: 10.1371/journal.pone.0144397.
52. Dobrovolskienė N., Pašukonienė V., Darinskas A., Kraško J.A., Žilionytė K., Mlyniska A., Gudlevičienė Z., Mišeikytė-Kaubrienė E., Schijns V., Lubitz W., Kudela P., Strioga M. Tumor lysate-loaded Bacterial Ghosts as a tool for optimized production of therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines. *Vaccine.* 2018; 36(29):4171–80. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.06.016.
53. Eko F.O., Hensel A., Bunka S., Lubitz W. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts following intraperitoneal immunization of mice. *Vaccine.* 1994; 12(14):1330–4. DOI: 10.1016/s0264-410x(94)80061-4.
54. Eko F.O., Mayr U.B., Attridge S.R., Lubitz W. Characterization and immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts expressing toxin-coregulated pili. *J. Biotechnol.* 2000; 83(1-2):115–23. DOI: 10.1016/s0168-1656(00)00315-1.
55. Eko F.O., Schukovskaya T., Lotzmanova E.Y., Firstova V.V., Emalyanova N.V., Klueva S.N., Kravtsov A.L., Livanova L.F., Kutnyrev V.V., Igietsme J.U., Lubitz W. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. *Vaccine.* 2003; 21(25-26):3663–74. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00388-8.
56. Eko F.O., Szostak M.P., Wanner G., Lubitz W. Production of *Vibrio cholerae* ghosts (VCG) by expression of a cloned phage lysis gene: potential for vaccine development. *Vaccine.* 1994; 12(13):1231–7. DOI: 10.1016/0264-410x(94)90249-6.
57. Eko F.O., Lubitz W., McMillan L., Ramey K., Moore T.T., Ananaba G.A., Lyn D., Black C.M., Igietsme J.U. Recombinant *Vibrio cholerae* ghosts as a delivery vehicle for vaccinating against *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine.* 2003; 21(15):1694–703. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00677-1.
58. Wang S., Li Y., Sun Y., Ji X., Zhu L., Guo X., Zhou W., Zhou B., Liu S., Zhang R., Feng S. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 166(3-4):138–44. DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.04.008.
59. Qian J., Bu Z., Lang X., Yan G., Yang Y., Wang X., Wang X. A safe and molecular-tagged *Brucella canis* ghosts confers protection against virulent challenge in mice. *Vet. Microbiol.* 2017; 204:121–8. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.04.027.
60. Wang S., Li Z., Zhang J., Xi L., Cui Y., Zhang W., Zhang J., Zhang H. A safe non-toxic *Brucella abortus* ghosts induce immune responses and confer protection in BALB/c mice. *Mol. Immunol.* 2020; 124:117–24. DOI: 10.1016/j.molimm.2020.06.002.
61. He C., Yang J., Zhao H., Liu M., Wu D., Liu B., He S., Chen Z. Vaccination with a *Brucella* ghost developed through a double inactivation strategy provides protection in Guinea pigs and cattle. *Microb. Pathog.* 2022; 162:105363. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105363.
62. Boman H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 2003; 254(3):197–215. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
63. King T.P., Jim S.Y., Wittkowski K.M. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespa vulgaris*): a mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 131(1):25–32. DOI: 10.1159/000070431.
64. Scocchi M., Zelezetsky I., Benincasa M., Gennaro R., Mazzoli A., Tossi A. Structural aspects and biological properties of the cathelicidin PMAP-36. *FEBS J.* 2005; 272(17):4398–406. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04852.x.
65. Lv Y., Wang J., Gao H., Wang Z., Dong N., Ma Q., Shan A. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential  $\alpha$ -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. *PLoS One.* 2014; 9(1):e86364. DOI: 10.1371/journal.pone.0086364.
66. Kim W.K., Moon J.Y., Cho J.S., Akanda M.R., Park B.Y., Kug Eo S., Park S.Y., Lee J.H., Hur J. *Brucella abortus* lysed cells using G124 induce robust immune response and provide effective protection in Beagles. *Pathog. Dis.* 2018; 76(1). DOI: 10.1093/femspd/ftx124.
67. Kim W.K., Moon J.Y., Cho J.S., Ochirkhuyag E., Akanda M.R., Park B.Y., Hur J. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by G124 against brucellosis in Korean black goats. *Can. J. Vet. Res.* 2019; 83(1):68–74.
68. Sumathi B., Veeragowda B., Byregowda S., Rathnamma D., Rajeswari S., Isloor S., Sobharani M., Venkatesha M., Narayanaswamy H. Construction of *Brucella melitensis* ghost as a putative vaccine candidate against re-emerging disease – Brucellosis. *Int. J. of Infect. Dis.* 2020; 101:475–6. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.09.1245.
69. Дентовская С.В., Копылов П.Х., Иванов С.А., Агеев С.А., Анисимов А.П. Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2013; 3:3–12.
70. Byvalov A.A., Konyshov I.V., Uversky V.N., Dентовская С.В., Анисимов А.П. *Yersinia* outer membrane vesicles as potential vaccine candidates in protecting against plague. *Biomolecules.* 2020; 10(12):1694. DOI: 10.3390/biom10121694.
71. Elkins K.L., Burns D.L., Schmitt M.P., Weir J.P. Vaccines against bioterror agents. In: Kaufmann S.H.E., editor. *Novel Vaccination Strategies.* 2004. P. 529–45. DOI: 10.1002/3527601449.ch24.
72. Kvitko B.H., Cox C.R., DeShazer D., Johnson S.L., Voorhees K.J., Schweizer H.P.  $\phi$ X216, a P2-like bacteriophage with broad *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* strain infectivity. *BMC Microbiol.* 2012; 12:289. DOI: 10.1186/1471-2180-12-289.
73. Witte A., Wanner G., Bläsi U., Halfmann G., Szostak M., Lubitz W. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E. *J. Bacteriol.* 1990; 172(7):4109–14. DOI: 10.1128/jb.172.7.4109-4114.1990.
74. Wu X., Ju X., Du L., Yuan J., Wang L., He R., Chen Z. Production of bacterial ghosts from gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2017; 14(1):1–7. DOI: 10.1089/tpd.2016.2184.
75. Chen H., Ji H., Kong X., Lei P., Yang Q., Wu W., Jin L., Sun D. Bacterial ghosts-based vaccine and drug delivery systems. *Pharmaceutics.* 2021; 13(11):1892. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111892.



## References

1. [Vaccines: the path from invention to application]. (Cited 28 Dec 2022). [Internet]. Available from: <https://asko-med.ru/blog/vaktsiny/vaktsiny-put-ot-izobreteniya-do-primeneniya/>.
2. [Comparison of the genome sizes of the virus, bacteria, and mammalian]. (Cited 28 Dec 2022). [Internet]. Available from: <https://kodomo.fbb.msu.ru/~nataliya.kashko/term1/comparison/index.html>.
3. Charlton Hume H.K., Lua L.H.L. Platform technologies for modern vaccine manufacturing. *Vaccine*. 2017; 35(35 Pt. A):4480–5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.02.069.
4. Monrad J.T., Sandbrink J.B., Cherian N.G. Promoting versatile vaccine development for emerging pandemics. *NPJ Vaccines*. 2021; 6(1):26. DOI: 10.1038/s41541-021-00290-y.
5. Langemann T., Koller V.J., Muhammad A., Kudela P., Mayr U.B., Lubitz W. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng. Bugs*. 2010; 1(5):326–36. DOI: 10.4161/bbug.1.5.12540.
6. Haq I.U., Chaudhry W.N., Akhtar M.N., Andleeb S., Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol. J.* 2012; 9(1):9. DOI: 10.1186/1743-422X-9-9.
7. Young I., Wang I., Roof W.D. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* 2000; 8(3):120–8. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01705-4.
8. Mendel S., Holbourn J.M., Schouten J.A., Bugg T.D.H. Interaction of the transmembrane domain of lysis protein E from bacteriophage  $\phi$ X174 with bacterial translocase MraY and peptidyl-prolyl isomerase SlyD. *Microbiology*. 2006; 152(10):2959–67. DOI: 10.1099/mic.0.28776-0.
9. Witte A., Wanner G., Sulzner M., Lubitz W. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 1992; 157(4):381–8. DOI: 10.1007/BF00248685.
10. Nakayama K., Kelly S.M., Curtiss R. Construction of an ASD+ expression-cloning vector: Stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Nat. Biotechnol.* 1988; 6(6):693–7. DOI: 10.1038/nbt0688-693.
11. Szostak M.P., Hensel A., Eko F.O., Klein R., Auer T., Mader H., Haslberger A., Bunka S., Wanner G., Lubitz W. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. *J. Biotechnol.* 1996; 44(1-3):161–70. DOI: 10.1016/0168-1656(95)00123-9.
12. Jechlinger W., Szostak M.P., Witte A., Lubitz W. Altered temperature induction sensitivity of the lambda pR/cI857 system for controlled gene E expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 173(2):347–52. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13524.x.
13. Fu L., Lu C. A novel dual vector coexpressing PhiX174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene on the basis of Lambda promoter pR and pL, respectively. *Mol. Biotechnol.* 2013; 54(2):436–44. DOI: 10.1007/s12033-012-9581-0.
14. Paukner S., Stiedl T., Kudela P., Bizik J., Al Laham F., Lubitz W. Bacterial ghosts as a novel advanced targeting system for drug and DNA delivery. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2006; 3(1):11–22. DOI: 10.1517/17425247.3.1.11.
15. Kloos D.U., Strätz M., Güttler A., Steffan R.J., Timmis K.N. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. *J. Bacteriol.* 1994; 176(23):7352–61. DOI: 10.1128/jb.176.23.7352-7361.1994.
16. Zhu W., Zhang Y., Liu X. Efficient production of safety-enhanced *Escherichia coli* ghosts by tandem expression of PhiX 174 mutant gene E and staphylococcal nuclease A gene. *Microbiol. Res.* 2015; 176:7–13. DOI: 10.1016/j.micres.2015.03.011.
17. Tian Q., Zhou W., Si W., Yi F., Hua X., Yue M., Chen L., Liu S., Yu S. Construction of *Salmonella pullorum* ghost by co-expression of lysis gene E and the antimicrobial peptide SMAP29 and evaluation of its immune efficacy in specific-pathogen-free chicks. *J. Integr. Agric.* 2018; 17(1):197–209. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61696-4.
18. Dentovskaya S.V., Vagaiskaya A.S., Platonov M.E., Trunyakova A.S., Kotov S.A., Krasil'nikova E.A., Titareva G.M., Mazurina E.M., Gape'chenko T.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Kombarova T.I., Gerasimov V.N., Uversky V.N., Anisimov A.P. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection. *Vaccines (Basel)*. 2021; 10(1):51. DOI: 10.3390/vaccines10010051.
19. Zhang X., Lan Y., Jiao W., Li Y., Tang L., Jiang Y., Cui W., Qiao X. Isolation and characterization of a novel virulent phage of *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Food Environ. Virol.* 2015; 7(4):333–41. DOI: 10.1007/s12560-015-9206-4.
20. Hou R., Li M., Tang T., Wang R., Li Y., Xu Y., Tang L., Wang L., Liu M., Jiang Y., Cui W., Qiao X. Construction of *Lactobacillus casei* ghosts by Holin-mediated inactivation and the potential as a safe and effective vehicle for the delivery of DNA vaccines. *BMC Microbiol.* 2018; 18(1):80. DOI: 10.1186/s12866-018-1216-6.
21. Yu S.Y., Peng W., Si W., Yin L., Liu S.G., Liu H.F., Zhao H.L., Wang C.L., Chang Y.H., Lin Y.Z. Enhancement of bacteriolysis of shuffled phage PhiX174 gene E. *Virol. J.* 2011; 8:206. DOI: 10.1186/1743-422X-8-206.
22. Haidinger W., Szostak M.P., Beisker W., Lubitz W. Green fluorescent protein (GFP)-dependent separation of bacterial ghosts from intact cells by FACS. *Cytometry*. 2001; 44(2):106–12.
23. Won G., Kim B., Lee J.H. A novel method to generate *Salmonella* Typhi Ty21a ghosts exploiting the  $\lambda$  phage holin-endolysin system. *Oncotarget*. 2017; 8(29):48186–95. DOI: 10.18632/oncotarget.18383.
24. Kwon S.R., Kang Y.J., Lee D.J., Lee E.H., Nam Y.K., Kim S.K., Kim K.H. Generation of *Vibrio anguillarum* ghost by coexpression of PhiX174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene. *Mol. Biotechnol.* 2009; 42(2):154–9. DOI: 10.1007/s12033-009-9147-y.
25. Zhang C., Zhao Z., Li J., Song K.G., Hao K., Wang J., Zhu B. Bacterial ghost as delivery vehicles loaded with DNA vaccine induce significant and specific immune responses in common carp against spring viremia of carp virus. *Aquaculture*. 2019; 504:361–8. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.021.
26. Kudela P., Paukner S., Mayr U.B., Cholujova D., Schwarczova Z., Sedlak J., Bizik J., Lubitz W. Bacterial ghosts as novel efficient targeting vehicles for DNA delivery to the human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunother.* 2005; 28(2):136–43. DOI: 10.1097/01.cji.0000154246.89630.6f.
27. Lv M., Qin Z., Yu J., Yuan J., Sun M., Wu C., Cai J. Immunogenicity of bacterial ghosts from *Escherichia coli* O78 isolated from ducklings. *Zhongguo Yufang Shouyi Xuebao / Chin. J. Prev. Vet. Med.* 2010; 32(9):712–5.
28. Ran X., Meng X.Z., Geng H.L., Chang C., Chen X., Wen X., Ni H. Generation of porcine *Pasteurella multocida* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in mice. *Microb. Pathog.* 2019; 132:208–14. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.04.016.
29. Amara A.A., Neama A.J., Hussein A., Hashish E.A., Sheweita S.A. Evaluation of the surface antigen of the *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ghosts prepared by "SLRP". *Sci. World J.* 2014; 2014:840863. DOI: 10.1155/2014/840863.
30. Amara A.A., Salem-Bekhit M.M., Alanazi F.K. Sponge-like: a new protocol for preparing bacterial ghosts. *Sci. World J.* 2013; 2013:545741. DOI: 10.1155/2013/545741.
31. Sheweita S.A., Batah A.M., Ghazy A.A., Hussein A., Amara A.A. A new strain of *Acinetobacter baumannii* and characterization of its ghost as a candidate vaccine. *J. Infect. Public Health*. 2019; 12(6):831–42. DOI: 10.1016/j.jiph.2019.05.009.
32. Rabea S., Salem-Bekhit M.M., Alanazi F.K., Yassin A.S., Moneib N.A., Hashem A.E.M. A novel protocol for bacterial ghosts' preparation using tween 80. *Saudi Pharm. J.* 2018; 26(2):232–7. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.12.006.
33. Palm-Apergi C., Hällbrink M. A new rapid cell-penetrating peptide based strategy to produce bacterial ghosts for plasmid delivery. *J. Control Release*. 2008; 132(1):49–54. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.08.011.
34. Li L., Lei L., Zhang S., Han W., Wang W. Preparation and experimental immunity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghost vaccine. *Chin. J. Vet. Sci.* 2012; 32(10):1461–7.
35. Kwon A.J., Moon J.Y., Kim W.K., Kim S., Hur J. Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (G124) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models. *J. Vet. Med. Sci.* 2016; 78(10):1541–8. DOI: 10.1292/jvms.16-0036.
36. Amara A.A. The critical activity for the cell wall degrading enzymes: Could the use of the lysozyme for Microbial Ghosts preparation establish emergence oral vaccination protocol? *Int. Sci. Invest. J.* 2016; 5(2):351–69.
37. Moon J.Y., Kim S.Y., Kim W.K., Rao Z., Park J.H., Mun J.Y., Kim B., Choi H.S., Hur J. Protective efficacy of a *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine candidate constructed with a recombinant lysozyme-PMAP36 fusion protein in a murine model. *Can. J. Vet. Res.* 2017; 81(4):297–303.
38. Wang Q., Wang X., Wang X., Feng R., Luo Q., Huang J. Generation of a novel *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia. *Fish Shellfish Immunol.* 2018; 81:49–56. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.055.
39. Choi C.W., Ji S.M., Park H.J., Oh S., Vinod N., No H.B. Method of preparing bacterial ghosts from gram-positive bacteria by hydrochloric acid treatment. US11,066,638B2. *US Patent App.* 2021-07-20.
40. Vinod N., Oh S., Park H.J., Koo J.M., Choi C.W., Kim S.C. Generation of a novel *Staphylococcus aureus* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in rats. *Infect. Immun.* 2015; 83(7):2957–65. DOI: 10.1128/IAI.00009-15.
41. Emirova Kh.M., Tolstova E.M., Kagan M.Yu., Orlova O.M., Abaseeva T.Yu., Pankratenko T.E., Shpikalova I.Yu. [Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*]. *Nefrologiya [Nephrology]*. 2016; 20(2):18–32.
42. Cai K., Gao X., Li T., Hou X., Wang Q., Liu H., Xiao L., Tu W., Liu Y., Shi J., Wang H. Intragastric immunization of mice

- with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts reduces mortality and shedding and induces a Th2-type dominated mixed immune response. *Can. J. Microbiol.* 2010; 56(5):389–98. DOI: 10.1139/w10-025.
43. Mayr U.B., Kudela P., Atrasheuskaya A., Bukin E., Ignatyev G., Lubitz W. Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. *Microb. Biotechnol.* 2012; 5(2):283–94. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00316.x.
44. Ran X., Chen X., Wang S., Chang C., Wen X., Zhai J., Ni H. Preparation of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) ghosts and immunogenic analysis in a mouse model. *Microb. Pathog.* 2019; 126:224–30. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.015.
45. Vilte D.A., Larzábal M., Mayr U.B., Garbaccio S., Gammella M., Rabinovitz B.C., Delgado F., Meikle V., Cantet R.J., Lubitz P., Lubitz W., Cataldi A., Mercado E.C. A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157:H7 in calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2012; 146(2):169–76. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.03.002.
46. Cai K., Tu W., Liu Y., Li T., Wang H. Novel fusion antigen displayed-bacterial ghosts vaccine candidate against infection of *Escherichia coli* O157:H7. *Sci. Rep.* 2015; 5:17479. DOI: 10.1038/srep17479.
47. Paton A.W., Chen A.Y., Wang H., McAllister L.J., Höggerl F., Mayr U.B., Shewell L.K., Jennings M.P., Morona R., Lubitz W., Paton J.C. Protection against Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* by non-genetically modified organism receptor mimic bacterial ghosts. *Infect. Immun.* 2015; 83(9):3526–33. DOI: 10.1128/IAI.00669-15.
48. Gong S., Nan N., Sun Y., He Z., Li J., Chen F., Li T., Ning N., Wang J., Li Z., Luo D., Wang H. Protective immunity elicited by VP1 Chimeric antigens of bacterial ghosts against hand-foot-and-mouth disease virus. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(1):61. DOI: 10.3390/vaccines8010061.
49. Lagzian M., Bassami M.R., Dehghani H. *In vitro* responses of chicken macrophage-like monocytes following exposure to pathogenic and non-pathogenic *E. coli* ghosts loaded with a rational design of conserved genetic materials of influenza and Newcastle disease viruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 176:5–17. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.05.005.
50. Cao J., Zhu X.C., Liu X.Y., Yuan K., Zhang J.J., Gao H.H., Li J.N. An oral double-targeted DNA vaccine induces systemic and intestinal mucosal immune responses and confers high protection against *Vibrio mimicus* in grass carps. *Aquaculture*. 2019; 504:248–59. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.006.
51. Hajam I.A., Dar P.A., Appavoo E., Kishore S., Bhanuprakash V., Ganesh K. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2015; 10(12):e0144397. DOI: 10.1371/journal.pone.0144397.
52. Dobrovol'skij N., Pašukonienė V., Darinskas A., Kraška J.A., Žilionytė K., Mlyniska A., Gudlevičienė Z., Mišeikytė-Kaubrienė E., Schijns V., Lubitz W., Kudela P., Strioga M. Tumor lysate-loaded Bacterial Ghosts as a tool for optimized production of therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines. *Vaccine*. 2018; 36(29):4171–80. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.06.016.
53. Eko F.O., Hensel A., Bunka S., Lubitz W. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts following intraperitoneal immunization of mice. *Vaccine*. 1994; 12(14):1330–4. DOI: 10.1016/s0264-410x(94)80061-4.
54. Eko F.O., Mayr U.B., Attridge S.R., Lubitz W. Characterization and immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts expressing toxin-coregulated pili. *J. Biotechnol.* 2000; 83(1-2):115–23. DOI: 10.1016/s0168-1656(00)00315-1.
55. Eko F.O., Schukovskaya T., Lotzmanova E.Y., Firstova V.V., Emalyanova N.V., Klueva S.N., Kravtsov A.L., Livanova L.F., Kuttyrev V.V., Igietseme J.U., Lubitz W. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. *Vaccine*. 2003; 21(25-26):3663–74. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00388-8.
56. Eko F.O., Szostak M.P., Wanner G., Lubitz W. Production of *Vibrio cholerae* ghosts (VCG) by expression of a cloned phage lysis gene: potential for vaccine development. *Vaccine*. 1994; 12(13):1231–7. DOI: 10.1016/0264-410x(94)90249-6.
57. Eko F.O., Lubitz W., McMillan L., Ramey K., Moore T.T., Ananaba G.A., Lyn D., Black C.M., Igietseme J.U. Recombinant *Vibrio cholerae* ghosts as a delivery vehicle for vaccinating against *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine*. 2003; 21(15):1694–703. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00677-1.
58. Liu J., Li Y., Sun Y., Ji X., Zhu L., Guo X., Zhou W., Zhou B., Liu S., Zhang R., Feng S. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 166(3-4):138–44. DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.04.008.
59. Qian J., Bu Z., Lang X., Yan G., Yang Y., Wang X., Wang X. A safe and molecular-tagged *Brucella canis* ghosts confers protection against virulent challenge in mice. *Vet. Microbiol.* 2017; 204:121–8. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.04.027.
60. Wang S., Li Z., Zhang J., Xi L., Cui Y., Zhang W., Zhang J., Zhang H. A safe non-toxic *Brucella abortus* ghosts induce immune responses and confer protection in BALB/c mice. *Mol. Immunol.* 2020; 124:117–24. DOI: 10.1016/j.molimm.2020.06.002.
61. He C., Yang J., Zhao H., Liu M., Wu D., Liu B., He S., Chen Z. Vaccination with a *Brucella* ghost developed through a double inactivation strategy provides protection in Guinea pigs and cattle. *Microb. Pathog.* 2022; 162:105363. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105363.
62. Boman H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 2003; 254(3):197–215. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
63. King T.P., Jim S.Y., Wittkowski K.M. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespa vulgaris*): a mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 131(1):25–32. DOI: 10.1159/000070431.
64. Scocchi M., Zelezetsky I., Benincasa M., Gennaro R., Mazzoli A., Tossi A. Structural aspects and biological properties of the cathelicidin PMAP-36. *FEBS J.* 2005; 272(17):4398–406. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04852.x.
65. Lv Y., Wang J., Gao H., Wang Z., Dong N., Ma Q., Shan A. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential  $\alpha$ -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. *PLoS One*. 2014; 9(1):e86364. DOI: 10.1371/journal.pone.0086364.
66. Kim W.K., Moon J.Y., Cho J.S., Akanda M.R., Park B.Y., Kug Eo S., Park S.Y., Lee J.H., Hur J. *Brucella abortus* lysed cells using GI24 induce robust immune response and provide effective protection in Beagles. *Pathog. Dis.* 2018; 76(1). DOI: 10.1093/femspd/ftx124.
67. Kim W.K., Moon J.Y., Cho J.S., Ochirkhuyag E., Akanda M.R., Park B.Y., Hur J. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. *Can. J. Vet. Res.* 2019; 83(1):68–74.
68. Sumathi B., Veeragowda B., Byregowda S., Rathnamma D., Rajeswari S., Isloor S., Sobharani M., Venkatesha M., Narayanaswamy H. Construction of *Brucella melitensis* ghost as a putative vaccine candidate against re-emerging disease – Brucellosis. *Int. J. of Infect. Dis.* 2020; 101:475–6. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.09.1245.
69. Dentovskaya S.V., Kopylov P.Kh., Ivanov S.A., Ageev S.A., Anisimov A.P. [Molecular basis of preventive vaccination against plague]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2013; (3):3–12.
70. Byvalov A.A., Konyshov I.V., Uversky V.N., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. *Yersinia* outer membrane vesicles as potential vaccine candidates in protecting against plague. *Biomolecules*. 2020; 10(12):1694. DOI: 10.3390/biom10121694.
71. Elkins K.L., Burns D.L., Schmitt M.P., Weir J.P. Vaccines against bioterror agents. In: Kaufmann S.H.E., editor. Novel Vaccination Strategies. 2004. P. 529–45. DOI: 10.1002/3527601449.ch24
72. Kvitko B.H., Cox C.R., DeShazer D., Johnson S.L., Voorhees K.J., Schweizer H.P.  $\phi$ X216, a P2-like bacteriophage with broad *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* strain infectivity. *BMC Microbiol.* 2012; 12:289. DOI: 10.1186/1471-2180-12-289.
73. Witte A., Wanner G., Bläsi U., Halfmann G., Szostak M., Lubitz W. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E. *J. Bacteriol.* 1990; 172(7):4109–14. DOI: 10.1128/jb.172.7.4109-4114.1990.
74. Wu X., Ju X., Du L., Yuan J., Wang L., He R., Chen Z. Production of bacterial ghosts from gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2017; 14(1):1–7. DOI: 10.1089/fpd.2016.2184.
75. Chen H., Ji H., Kong X., Lei P., Yang Q., Wu W., Jin L., Sun D. Bacterial ghosts-based vaccine and drug delivery systems. *Pharmaceutics*. 2021; 13(11):1892. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111892.

#### Authors:

Vagaiskaya A.S., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

#### Об авторах:

Вагайская А.С., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., р.п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.