

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР "ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ" РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ЗЫКОВА АННА АНДРЕЕВНА

**КОНСТРУИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ
БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА**

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Куприянов Виктор Васильевич

МОСКВА – 2024 г

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1. Общее представление о вирусе гриппа	9
2. Создание противогриппозных вакцин	21
3. Вакцинные платформы, используемые для разработки универсальных вакцин-кандидатов против гриппа	31
4. Наночастицы на основе искусственных самособирающихся пептидов как носители антигенов	33
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
РЕЗУЛЬТАТЫ	53
1. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, с помощью бактериальной системы экспрессии	53
1.1. Получение самособирающихся наночастиц из рекомбинантных белков на основе пептида SAP	54
1.2. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, содержащих M2e пептид и консервативную последовательность второй субъединицы гемагглютинаина HA2, характеристика их иммуногенности и протективного действия	59
1.3. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, содержащих M2e пептид, консервативную последовательность второй субъединицы гемагглютинаина HA2, консервативные последовательности нуклеопротеина NP, и Т-хелперный эпитоп PADRE, характеристика их иммуногенности и протективного действия	72
2. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, с использованием растительной системы экспрессии	82
2.1. Получение наночастиц на основе SAP пептида	82
2.2. Получение наночастиц на основе SAP пептида, несущих антигены вируса гриппа	84
2.3. Иммуногенность и протективность белка 19S-SAP-Sp-4M2eh, полученного в растительной системе экспрессии	88
ОБСУЖДЕНИЕ	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	103
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- AMV – вирус мозаики люцерны
- GLRaV2 – вирус скрученности листьев винограда
- HA – гемагглютинин
- HBc – капсидный белок вируса гепатита В (Hepatitis B core)
- His – гистидиновая последовательность
- HLA – главный комплекс гистосовместимости у человека
- IFN – интерферон
- Ig – иммуноглобулин
- IL – интерлейкин
- IPTG – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
- M2e – внеклеточный домен M2 белка вируса гриппа
- MHC-I, MHC-II – молекула главного комплекса гистосовместимости I, II класса (major histocompatibility complex I, II)
- NA – нейраминидаза
- NP – нуклеопротеин
- PADRE (Pan DR Epitope) – универсальный T-хелперный эпитоп
- PAMP – молекулярный фрагмент, ассоциированный с патогеном (pathogen associated molecular pattern)
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PB1, PB2, PA- компоненты РНК - зависимого полимеразного комплекса
- PVX – вирус X картофеля
- RNP – рибонуклеопротеин
- SAP – самособирающийся пептид
- SAPN – самособирающиеся белковые наночастицы (self-assembling polypeptide nanoparticle)
- Sp – спиральный пептид
- Tem – эффекторные T-клетки памяти
- VLP (ВПЧ) – вирусоподобные частицы
- а.о. – аминокислотный остаток
- АПК – антигенпрезентирующие клетки
- КИ – клинические испытания

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы

Вирусы гриппа оказывают огромное влияние на общественное здравоохранение, и вакцинация считается наилучшей стратегией борьбы с этим заболеванием. В настоящее время лицензированные вакцины против сезонного гриппа являются штамм-специфичными. Из-за частого изменения антигенных характеристик вируса необходимы дополнительные усилия в области эпидемиологического надзора, чтобы определить подходящие штаммы для вакцин против сезонного гриппа. Как только появляется новый штамм, вакцина обеспечивает лишь частичную защиту или вообще ее не обеспечивает. Ограниченный диапазон защиты подразумевает, что существующие вакцины против гриппа не способны защитить от постоянно возникающих новых штаммов, а также от случаев инфицирования людей часто возникающими зоонозными вирусами гриппа. Разработать и оперативно наработать вакцину, специфичную для штамма, достаточно быстро, чтобы контролировать пандемию, является сложным процессом. Поэтому есть потребность в вакцине против гриппа с широким спектром действия, защищающей от различных штаммов.

Вакцинная платформа должна содержать различные антигены, которые были бы способны индуцировать устойчивый клеточный и гуморальный иммунитет. Одной из наиболее перспективных стратегий в разработке таких вакцин является использование консервативных целевых антигенов для выработки широко кросс-реактивных антител, а также Т-клеточного ответа. Большинство универсальных вакцин-кандидатов против гриппа нацелены на консервативные антигены вируса гриппа, такие как внеклеточный домен мембранного белка М2 (М2е), последовательности второй субъединицы гемагглютинина (НА2), консервативные участки нуклеопротеина и нейраминидазы для обеспечения широкой защиты (Gerhard *et al.*, 2006).

М2е является высококонсервативным пептидом, который может быть использован для разработки универсальной вакцины против гриппа А. Различные типы вакцин на основе М2е, такие как ДНК-вакцины, рекомбинантные вакцины, вакцины на основе вирусоподобных частиц способны обеспечивать определенный уровень защиты широкого спектра действия на животных моделях (Saelens 2019, Schotsaert *et al.*, 2009). Гемагглютинин тоже имеет консервативные участки в области второй субъединицы (НА2). Такие фрагменты способны индуцировать образование антител против широкого спектра гемагглютининов разных подтипов (Corti *et al.*, 2011). Известно, что вакцинные препараты на основе рекомбинантных белков, включающих М2е и эпитопы НА2, имеют высокую иммуногенность и обладают протективными свойствами (Цыбалова и др., 2017, Stepanova *et al.*, 2018). Еще одним целевым антигеном для разработки универсальной вакцины могут быть консервативные

последовательности нуклеопротеина (NP). Белок NP относительно консервативен в вирусах гриппа А, вариации в аминокислотных последовательностях у него составляют менее 11% (Shu *et al.*, 1993). Благодаря консервативности и индукции широкого NP-специфического иммунитета, NP является привлекательным для разработки универсальной вакцины против гриппа.

Однако задача создания высокоиммуногенных вакцинных препаратов на основе консервативных гриппозных антигенов далеко не решена, а по своей эффективности разрабатываемые кандидатные вакцины пока уступают традиционным штамм-специфическим вакцинам. Одним из активно развивающихся направлений в иммунологии является разработка вакцин на основе наноразмерных вирусоподобных частиц (VLP), которые значительно повышают иммуногенность пептидов, находящихся на их поверхности. Наночастицы являются эффективной платформой для представления целевых иммуногенов антиген-презентирующим клеткам и индуцирования иммунного ответа на основе В- и Т - клеток (Kuhn *et al.*, 2014). Чаще всего для получения вирусоподобных частиц используются капсидные белки вирусов, которые могут самопроизвольно собираться в наноразмерные структуры. Введение чужеродных эпитопов в капсидные белки позволяет получать рекомбинантные белки, которые собираются в частицы, представляющие плотный массив эпитопов на поверхности. Хотя известны случаи, когда довольно крупные белки (например, GFP) могут быть представлены на поверхности вирусоподобных частиц, образованных вирусными капсидами, чаще такие вставки изменяют пространственную структуру белка капсида, нарушая сборку частиц. В качестве альтернативного «строительного блока» для создания VLP могут быть использованы искусственные пептиды, способные к самоагрегации с формированием наноразмерных частиц. Различные виды самособирающихся пептидов (SAP) были успешно использованы для презентации коротких антигенов (Kaba *et al.*, 2009, Babaroor *et al.*, 2011, Wahome *et al.*, 2012). Таким образом, наночастицы на основе самособирающихся пептидов являются многообещающими платформами для презентации антигенов.

Цель и задачи исследования

Целью работы является конструирование рекомбинантных наночастиц на основе самособирающегося пептида, несущих консервативные антигены вируса гриппа А, разработка методов их получения в бактериальной и растительной системах экспрессии, изучение иммуногенности и протективного действия на животных.

Были поставлены следующие задачи:

1. Дизайн и создание генетических конструкций для получения рекомбинантных белков на основе самособирающегося пептида SAP, включающих антигены вируса гриппа А:

консенсусную последовательность внеклеточного домена M2 белка, фрагмент второй субъединицы гемагглютинаина, эпитопы нуклеопротеина, а также универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE.

2. Продукция рекомбинантных белков в бактериях *Escherichia coli* и их выделение и очистка.

3. Продукция рекомбинантных белков в растениях *Nicotiana benthamiana* и их выделение и очистка.

4. Получение наночастиц в результате рефолдинга рекомбинантных белков *in vitro*.

5. Характеристика структуры наночастиц методами динамического светорассеяния, атомно-силовой и электронной микроскопии.

6. Определение иммуногенности и протективного действия рекомбинантных белков на лабораторных животных.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являлись рекомбинантные наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP, несущие антигены вируса гриппа. Предметом исследования является получение в бактериальной и растительной системе экспрессии этих рекомбинантных наночастиц, характеристика их структуры, оценка иммуногенности и протективного действия на животных.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Сконструированы химерные гены и получены в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе самособирающегося пептида SAP, содержащие консервативные антигены вируса гриппа А: M2e пептид, фрагмент второй субъединицы гемагглютинаина (HA2) и эпитопы нуклеопротеина. Полученные в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе самособирающегося пептида SAP после рефолдинга белка *in vitro* образуют наноразмерные частицы. Наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP, несущие антигены вируса гриппа, обладают высокой иммуногенностью и обеспечивают защиту иммунизированных мышей от летальной гриппозной инфекции. Иммунизация мышей наночастицами, несущими одновременно M2e и HA2, индуцировала сильный гуморальный иммунный ответ против M2e и целого вируса гриппа, а также образование антиген-специфичных многофункциональных CD4+ эффекторных Т-клеток памяти, секретирующих цитокины. Иммунизация наночастицами, несущими M2e, HA2, эпитопы нуклеопротеина, а также универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE, индуцирует гуморальный иммунный ответ против M2e и целого вируса, а также

образование антиген-специфичных многофункциональных CD4+ и CD8+ эффекторных Т-клеток памяти, секретирующих цитокины.

С помощью растительной системы экспрессии был получен рекомбинантный белок на основе самособирающегося пептида SAP, несущий M2e пептид вируса гриппа, который после рефолдинга *in vitro* образует наноразмерные частицы. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцирует высокие уровни M2e-специфических антител и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

Практическая значимость работы обусловлена возможностью использования разработанных рекомбинантных наночастиц для создания противогриппозных кандидатных вакцин. Полученные наночастицы в ходе испытаний на лабораторных животных показали высокую иммуногенность и протективное действие.

Методология исследования

В работе проведен дизайн, получение и функциональная характеристика рекомбинантных наночастиц – носителей консервативных антигенов вируса гриппа А для разработки вакцины широкого спектра действия. Проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Для создания химерных генов, кодирующих рекомбинантные белки, были использованы методы генетической инженерии. Для получения рекомбинантных белков использовали методы экспрессии белков в бактериях *Escherichia coli* и растениях *Nicotiana benthamiana*, выделение белков проводили с использованием метал-аффинной хроматографии, структуру вирусоподобных частиц характеризовали методами электронной и атомно-силовой микроскопии, для функциональной характеристики кандидатных вакцин использовали иммунологические методы, протективное действие изучали в экспериментах на лабораторных животных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полученные в бактериальной и растительной системе экспрессии рекомбинантные самособирающиеся наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP могут быть использованы в качестве носителей эпитопов вируса гриппа.

2. Самособирающийся пептид SAP, к С-концу которого присоединен M2e пептид вируса гриппа А, образует наночастицы сферической формы, которые при иммунизации мышей индуцируют гуморальный иммунный ответ против M2e и обеспечивают защиту от летальной гриппозной инфекции.

3. Самособирающийся пептид SAP, к С-концу которого присоединены консервативный фрагмент гемагглютинина HA2 и M2e пептид вируса гриппа А, образует наночастицы

сферической формы. При иммунизации мышей препарат индуцирует гуморальный иммунный ответ против М2е и вируса гриппа А, образование М2е-специфичных многофункциональных CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти, и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

4. Самособирающийся пептид SAP, к N-концу которого присоединены эпитопы нуклеопротеина и универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE, а к С-концу - консервативный фрагмент гемагглютинаина HA2 и М2е пептид вируса гриппа А, образует наночастицы сферической формы. При иммунизации мышей препарат индуцирует гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ против М2е и вируса гриппа А, и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

Степень достоверности и апробация результатов

В ходе работы применялись современные методы исследования. Эксперименты проводились на современном оборудовании с использованием реактивов от ведущих российских и международных компаний. Обработка полученных результатов осуществлялась с помощью соответствующих методов анализа. Все результаты, представленные в работе, являются статистически достоверными и воспроизводимыми.

Результаты работы были представлены автором на научных конференциях: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» 2016 (Пущино), XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» 2016 (Москва), XXIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022» 2022 (Москва), IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» 2022 (Москва), IV Международный форум «Дни Вирусологии 2023» 2023 (Санкт-Петербург), 77-я Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» 2024 (Нижний Новгород).

Личный вклад соискателя

Большая часть исследований, вошедших в диссертацию, была выполнена самим соискателем. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, в обработке полученных данных, а также в написании публикаций и текста самой диссертации. Эксперименты на лабораторных животных осуществлялись в сотрудничестве с ФГБУ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева Минздрава России.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Общее представление о вирусе гриппа

Вирусы гриппа представляют собой оболочечные РНК-содержащие вирусы, принадлежащие к семейству Orthomyxoviridae. Общим признаком для этого семейства является наличие сегментированной одноцепочечной минус-цепи РНК в геноме. Существует четыре рода вирусов гриппа Alphainfluenzavirus, Betainfluenzavirus, Gammainfluenzavirus, Deltainfluenzavirus, разделенных на основе антигенного различия внутренних белков вириона (M1 и NP). Вирусы человеческого гриппа А и В вызывают сезонный грипп, при этом вирусы гриппа А могут вызывать пандемии. Вирусы гриппа А делятся на две филогенетические группы по подтипам гемагглютинина (НА). Вирусы группы 1 включают НА1, НА2, НА5, НА6, НА8, НА9, НА11, НА12, НА13, НА16, НА17 и НА18, а вирусы группы 2 содержат подтипы НА3, НА4, НА7, НА10, НА14 и НА15. Помимо 18 подтипов гемагглютининов известно 11 подтипов нейраминидазы (НА). Вирусы гриппа В представлены двумя линиями: В/Yamagata и В/Victoria (Rota *et al.*, 1990). Вирусы гриппа С менее распространены и, как известно на данный момент, вызывают только легкие заболевания у людей. Вирусы гриппа D не заражают человека (Smith *et al.*, 2016), но заражают крупный рогатый скот, свиней, жвачных животных, лошадей и верблюдов (Asha and Kumar, 2019).

Для номенклатуры вирусов гриппа по рекомендации ВОЗ используются определенные параметры в следующей последовательности: тип, географическая локализация, номер штамма, год выделения, название животного, от которого был выделен вирус (для человека не указывается), номера подтипов поверхностных белков гемагглютинина и нейраминидазы (для вирусов гриппа А). Например, вирус гриппа А, изолированный в Москве в 1999 под порядковым номером 10 с антигенным подтипом H3N2, называется «А/Moscow/10/99 (H3N2)».

Грипп может проявляться как в виде пандемий, эпидемий, вспышек, так и в виде отдельных спорадических случаев. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, ежегодные эпидемии гриппа приводят примерно к 3-5 миллионам случаев тяжелой инфекции и к 290 000 до 650 000 смертей каждый год (<https://www.who.int/ru>). Эпидемии приводят к увеличению госпитализаций и нагрузке медицинской системы, что влечет за собой кризис в здравоохранении и экономические убытки.

1.1. Антигенная изменчивость вирусов гриппа

Пандемии гриппа происходят глобально. Они возникают внезапно, распространяются по всему миру и приводят к большому количеству смертей. Сейчас считается, что всего было десять пандемий, а также три возможных, если отсчет брать с 1590 года (Potter, 2001).

За двадцатый век у людей произошли четыре пандемии гриппа. Самая известная из них – «Испанка» (H1N1), случившаяся в 1918-1920 годах и унесшая, по оценкам, не менее 21 миллиона жизней. Следующей была пандемия «Азиатского гриппа» H2N2 в 1957-1958 годах. В 1968 году возник новый штамм вируса H3N2 («Гонконгский грипп»), полностью заменивший H2N2 и вызвавший новую глобальную пандемию с высокой смертностью. В 1977-1978 гг. была новая пандемия – «Русский грипп», вызванная штаммом H1N1, который возник в России в результате мутации и распространился по миру. В 21 веке, в 2009 году, была пандемия «свиного» гриппа H1N1.

Генетическая изменчивость, сегментированный геном вируса, наличие большого числа переносчиков и давление иммунного фона популяций, восприимчивых к вирусу гриппа, способствуют появлению новых штаммов вируса, которые могут вызвать пандемию. Антигенные изменения происходят двумя способами: медленно, но непрерывно («антигенный дрейф»), и неожиданно, но эпизодически («антигенный шифт»).

Антигенный дрейф возникает из-за накопления точечных мутаций, т.к. РНК-полимеразы могут делать ошибки в процессе репликации. Это приводит к появлению множества субтипов гриппа А с различными типами гемагглютининов и нейраминидаз. Так, например, НА белок эволюционирует быстрее чем PB2, NP и M1 белки, потому что он в большей степени подвержен давлению селективного отбора под влиянием иммунного фона инфицируемой популяции.

Антигенный шифт - результат рекомбинации генов вируса гриппа при смешанной инфекции несколькими подтипами вирусов (реассортации). Это создает множество комбинаций различных НА и NA подтипов, а также других вирусных генов, которые могут распространяться среди инфицированных животных. Антигенный шифт встречается очень редко, но он является потенциальной причиной пандемий и эпидемий. Примеры межвидового переноса включают инфицирования людей птичьими и свиными вирусами гриппа H5N1, H9N2, H7N3, H7N2 в Юго-Восточной Азии, Европе и США (Peiris *et al.*, 1999). Среди этих штаммов H5N1 вызывает высокий уровень смертности - около 50%, что приводит ко многим госпитализациям и смертельным исходам (Neumann, 2015). Птичий вирус H1N1 адаптировался к человеку и вызвал пандемию «Испанки» в 1918 году. В 1957 году «Азиатский грипп» H2N2 возник путем реассортации с птичьим вирусом H2N2, и приобрел его H2 (НА), N2 (NA), PB1 гены. Аналогичная реассортация с птичьим вирусом гриппа (H3 (НА) и PB1 генов) произошла в 1968 году, что привело к появлению Гонконгского гриппа (H3N2). В 2009 году, реассортация между человеческим H3N2, свиным H1N1 и североамериканским птичьим вирусами привела к появлению свиных вирусов H3N2 и H1N2, которые рекомбинировали со свиным

«птицеподобным» вирусом, и в результате возник свиной вирус H1N1, который очень похож на штамм, циркулировавший в середине 1950х годов (Neumann *et al.*, 2009).

1.2. Структура вирусов гриппа А

Вирионы вируса гриппа А имеют плеоморфную форму, приближающуюся к сферической, размером 80-300 нм. Вирусные частицы состоят из нуклеопротеидного комплекса, заключенного в липопротеиновую оболочку. Нуклеопротеидный комплекс состоит из восьми одноцепочечных (-) РНК фрагментов, связанных с нуклеопротеиновым белком (NP). В вирусную оболочку встроены гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), а также расположены ионные каналы, сформированные матричным белком М2. Матричный белок М1, выстилает изнутри мембранную оболочку вируса и связывает ее с нуклеопротеидом (Рис. 1).

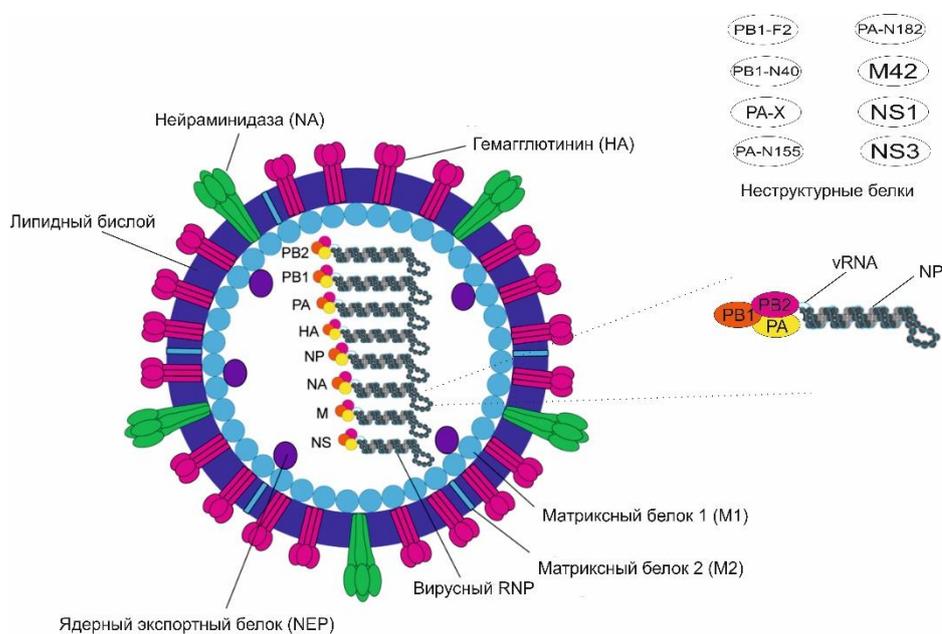


Рисунок 1. Структурная организация вируса гриппа А (Chauhan and Gordon, 2022).

Геном вируса гриппа А представляет собой восемь отдельных одноцепочечных отрицательных РНК фрагментов, которые кодируют в общей сложности 17 белков (Таблица 1). Белки гемагглютинин (HA), нейраминидаза (NA), нуклеопротеин (NP), и компоненты РНК-зависимого РНК-полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA) кодируются соответствующими сегментами генома. Кроме того, с сегмента PB1 экспрессируется про-апоптотический фактор вирулентности PB1-F2, а также белок N40. Сегмент М кодирует матричные белки М1 и М2, включая сплайсированный вариант М2, обозначаемый М42, с антигенно-отличным эктодоменом (Wise *et al.*, 2012). Ядерный экспортный белок NS2/NEP (nuclear export protein), неструктурный белок NS1 (non structural protein 1) кодируются сегментом NS. Также был

идентифицирован новый белок вируса гриппа А, обозначенный как NS3, возникший в результате мутации и альтернативного сплайсинга мРНК NS1, что связано с переходом от птиц к новым хозяевам-свиньям, людям (Selman *et al.*, 2012). Каждый из восьми сегментов генома формирует рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP), связанный с РНК-полимеразным комплексом вируса.

Таблица 1. РНК сегменты вируса гриппа А и функции кодируемых ими белков.

РНК сегмент	Кодируемые белки	Главные функции
PB2	PB2	Субъединица полимеразы, распознает 5'-концевой кэп мРНК
PB1	PB1	Каталитическая субъединица полимеразы с эндонуклеазной активностью, служащая для элонгации РНК
	PB1-F2	Про-апоптотическая активность
	PB1-N40	Полимеразная активность
PA	PA	Субъединица полимеразы с протеазной активностью
	PA-X	Экспрессия провоспалительных цитокинов, поддержание репликации вируса
	PA-N155	Поддержание репликации вируса
	PA-N182	Поддержание репликации вируса
HA	HA1	Связывание с рецептором, антигенный детерминант
	HA2	Слияние мембран
NP	NP	Регулирует ядерный импорт, инкапсуляция вирусного генома
NA	NA	Поверхностный гликопротеин, обеспечивает освобождение от рецепторов и выход вирусов из клетки, предотвращает агрегацию вируса
M	M1	Взаимодействует с рибонуклеопротеиновыми комплексами, ядерный экспорт РНК, сборка вирионов
	M2	Формирует ионный канал, регулирование внутреннего рН вирионов, раздевание вируса, сборка вирионов и почкование
	M42	Поддержание репликации вируса
NS	NS1	Ядерный экспорт вирусных мРНК, супрессор antiviralного ответа хозяина
	NS2/NEP	Ядерный экспортный белок, контроль ядерно-цитоплазматического транспорта мРНК
	NS3	Специфичность хозяина

Гемагглютинин

Гемагглютинин (HA) – один из главных трансмембранных гликопротеинов. Он занимает около 80% поверхности вируса. HA играет ключевую роль при прикреплении вируса к клетки хозяина и дальнейшем проникновении в клетку посредством слияния вирусной и клеточной мембраной. Вторая его роль – слияние вирусной мембраны с эндосомальной и дальнейший выход генетического материала в цитоплазму. Против HA направлен основной antiviralный

иммунитет. HA является основным антигеном вируса гриппа и мишенью для вируснейтрализующих антител.

Гемагглютинин представляет собой гомотример, прикрепленный к липидной мембране вируса. Каждый мономер имеет глобулярную головку, содержащую рецептор-связывающий домен, и стеблевой участок. Мономер представляет собой полипептидную цепь, состоящую из двух субъединиц – HA1 и HA2, которые связаны дисульфидными мостиками. Субъединица HA1 связывается с молекулой сиаловой кислоты на поверхности клетки-хозяина и с помощью эндоцитоза вирус проникает внутрь. HA2 содержит гидрофобный фьюжн-пептид на N-конце. В эндосоме происходит закисление среды и гемагглютинин претерпевает изменения, а именно гидрофобный фьюжн-пептид на N-конце HA2 (пептид слияния) высвобождается из гидрофобного кармана и HA1 отделяется от HA2. Происходит слияние вирусной и эндосомальной мембран и выход вирусного генома в цитоплазму. Пептид слияния имеет вторичную спиральную структуру, которая важна для взаимодействия HA с эндосомальной мембраной (Cross *et al.*, 2009).

Нейраминидаза

Нейраминидаза (NA) - поверхностный гликопротеин, представляющий собой тетрамер. N-конец нейраминидазы содержит цитоплазматический «хвост», состоящий из 6 аминокислот. Эта последовательность высококонсервативна, однако, ее функции до конца неясны. Мутация в этой области снижает продукцию частиц и влияет на их морфологию (Jin *et al.*, 1997). Далее располагается трансмембранный домен или «стебель», который заякоривает молекулу на вирусной мембране. Этот домен выполняет функцию сигнального пептида-якоря, направляя NA в эндоплазматический ретикулум и удерживая NA в мембране. Далее располагается активный центр нейраминидазы - шип, который отвечает за взаимодействие с сиаловыми кислотами клетки при выходе вируса. В головке расположены также все сайты гликозилирования нейраминидазы.

NA играет важную роль при выходе вируса из клетки. Нейраминидаза катализирует расщепление терминальных α -(2,3 или 2,6)-кетозидных связей остатков сиаловой кислоты при отпочковывании вирусных частиц, выходящих из клетки, с которой связан HA. Это имеет критическое значение, поскольку без этого дочерние вирусные частицы, связанные с HA на клеточной поверхности, не могут освободиться и участвовать в следующем цикле заражения. Таким образом, нейраминидаза обеспечивает высвобождение вирусных частиц, что является необходимым условием для дальнейшего распространения инфекции.

Матриксный белок M2

Матриксный белок M2 тоже является поверхностным белком вируса гриппа. На поверхности вирусных частиц он представлен в намного меньшем количестве (16-20 молекул

на вирион), чем другие поверхностные гликопротеины – HA, NA. Однако на поверхности инфицированных эпителиальных клеток он представлен с высокой плотностью (Sui *et al.*, 2009).

M2 представляет собой гомотетрамер, мономер которого состоит из 97 а.о. N-концевой домен (24 а.о.) или по-другому эктодомен располагается снаружи вириона, далее идет трансмембранный домен (19 а.о.), расположенный в липидном бислое, затем С-концевой цитоплазматический хвост (54 а.о.). Эктодомен вместе с трансмембранным доменом формируют ионный канал. Ионный канал сформирован четырьмя мономерами, которые связаны дисульфидными связями. Поток протонов через мембрану проходит через пору, образованную четырьмя одинаковыми субъединицами трансмембранного белка M2, и протоны взаимодействуют с аминокислотами, которые формируют внутреннюю поверхность канала. Канал является селективным и однонаправленным (Pinto and Lamb, 2006).

Функцией такого ионного канала является регуляция рН среды в процессе раздевания вируса в эндосоме. Транспорт протонов внутрь вирусной частицы приводит к закислению, в результате происходит диссоциация матриксного белка 1 с рибонуклеопротеинами, изменение конформации NA, и последующее слияние вирусной и эндосомальной мембран. Важным условием для работы канала является рН внутри эндосомы. Канал закрыт, когда рН превышает 7,5 и открыт, когда рН ниже, чем 6,5. Таким образом, высокий рН закрывает канал, а низкий рН открывает канал.

Трансмембранный домен представлен спиральной структурой, расположенной под углом 25 градусов в липидном бислое. Четыре таких спирали формируют пору, на внутренней поверхности которой находятся аминокислотные остатки Ala30, Gly34, His37, и Trp41, обеспечивающие транспорт протонов сквозь мембрану (Pinto and Lamb, 2006). Еще одной структурной частью белка M2 является цитоплазматический хвост. Это самый длинный домен, и он играет важную роль во взаимодействии между M1 и M2 белками, в упаковке вирусной РНК и отпочковывании вириона (McCown and Pekosz, 2006).

Противовирусные препараты, которые подавляют работу M2 ионного канала, эффективно ингибируют репликацию вируса гриппа. Такие ингибиторы, как амантадин и римантадин, связываются с M2 белком и угнетают работу ионного канала. Эти препараты использовались в клинической практике в течение многих лет. Например, римантадин связывается в четырех местах внутри M2 ионного канала, располагаясь рядом с триптофановым «входом» на липидной стороне и стабилизирует закрытую конформацию поры. Однако, несмотря на свою эффективность, данные противовирусные препараты, нацеленные на M2 белок, со временем утратили свою действенность. Это произошло вследствие быстрой эволюции вирусов гриппа (Du *et al.*, 2010).

Помимо роли ионного канала, М2 белок участвует в процессе регуляции апоптоза клетки. Комплекс М2-Нsp40-p58, где М2 взаимодействует с белком теплового шока Нsp40, а тот с ингибитором протеинкиназы R – белком p58, приводит к фосфорилированию протеинкиназы R и к клеточной гибели (Guan *et al.*, 2010).

Матриксный белок М1

Матриксный белок М1 выстилает внутреннюю поверхность липидного слоя вириона и определяет морфологию вирионов. М1 включает три домена: N-концевой домен (1-87 а.о.), средний домен (87-165 а.о.) и C-концевой домен (165-252 а.о.). Между средним и C-концевым доменом находится домен цинковых пальцев - последовательность аминокислот, содержащая цистеин и гистидин. Он отвечает за связь с одноцепочечной вирусной РНК (Golebiewski *et al.*, 2011). М1 взаимодействует с RNP комплексами и контролирует экспорт РНК из ядра, далее участвует при сборке вирионов.

Нуклеопротеин

Нуклеопротеин (NP) –внутренний белок вириона, взаимодействующий с белком М1, РНК и белками-полимеразами. Одной из основных функций NP является его опосредованное вирусной РНК взаимодействие с кэп-связывающим доменом PB2, которое облегчает инициацию транскрипции и репликацию в ядре клетки-хозяина (Szeto *et al.*, 2020, Newcomb *et al.*, 2009). Ассоциация NP с вирусной РНК (вРНК) происходит неоднородным образом и необходима для упаковки и поддержания стабильности вРНК (Bolte *et al.*, 2019). Кроме того, NP участвует в транспорте вРНК как в ядро клетки, так и из ядра посредством сигналов ядерного экспорта (NES) и передачи сигналов ядерной локализации (NLS) (Ozawa *et al.*, 2007).

РНК-зависимая-РНК-полимераза

РНК-зависимая РНК-полимераза взаимодействует с NP и РНК и состоит из 5 белков: PB1, PB1-F2, N40, PB2 и PA. Три из них - PA, PB2 и PB1 - образуют гетеротример, который связывается с вирусной РНК и с NP с образованием вирусного комплекса RNP, необходимого для транскрипции и репликации в ядре клетки-хозяина (Obayashi *et al.*, 2008). Белок N40 является N-концевой усеченной формой белка PB1. В результате PB1-N40 не взаимодействует с PA, однако он все еще может взаимодействовать с PB1, PB2, PB1-F2 и NP. Было отмечено, что, хотя PB1-N40 не влиял на вирусную жизнеспособность, потеря экспрессии PB1-N40 была негативной для его репликации, снижая активность полимеразы и замедляя кинетику репликации (Wise *et al.*, 2009). Это позволило предположить, что PB1-N40 поддерживает репликацию вируса. Белок PB1-F2 проявляет про-апоптотическую активность.

1.3. Жизненный цикл вируса гриппа

Вирус гриппа А прикрепляется к рецепторам с α -2,6- сиаловыми кислотами, которые представлены на эпителиальных клетках респираторной системы.

Проникновение в клетку осуществляется с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза (Рис. 2). Субъединица HA1 гемагглютинина связывается с клеточными рецепторами, что приводит к проникновению вируса в клетку-хозяина посредством эндоцитоза. Вирусная частица попадает в состав эндосомы. Дальнейший путь зависит от понижения pH и требует работы киназ C, Rab5, Rab7. Низкий эндосомальный pH запускает открытие ионных каналов M2, вызывая конформационное изменение белка HA. Происходит слияние эндосомальной и вирусной мембран и освобождению вирусных RNP в цитоплазму клетки-хозяина. Затем RNP транспортируются в ядро через ядерные поры посредством использования сигналов ядерной локализации NLS, расположенных в белке NP (Cros *et al.*, 2005).

В ядре происходит процесс транскрипции и репликации отрицательной вирусной РНК ((-)РНК) с помощью РНК-зависимой РНК полимеразы. После транскрипции матричная (+)РНК перемещается в цитоплазму, где на рибосомах происходят процессы трансляции. После репликации РНК из ядра перемещается в цитоплазму для сборки вирусных частиц. Белки M1, NEP и NP играют решающую роль в ядерном экспорте вирусных RNP комплексов через ядерные поры. Белок M1 способствует цитоплазматическому транспорту вирусных RNP, препятствуя их возвращению обратно в ядро и привлекая их к плазматической мембране для сборки вириона и почкования.

Вирусные белки HA, NA и M2 транспортируются через аппарат Гольджи и встраиваются в плазматическую мембрану. Здесь происходит почкование и отделение дочерних вирусных частиц. Для того чтобы вирусные частицы отделились от клетки во время почкования на плазматической мембране, NA, благодаря своей каталитической активности, гидролизует гликозидные связи между остатками сиаловых кислот и молекулами сахара.

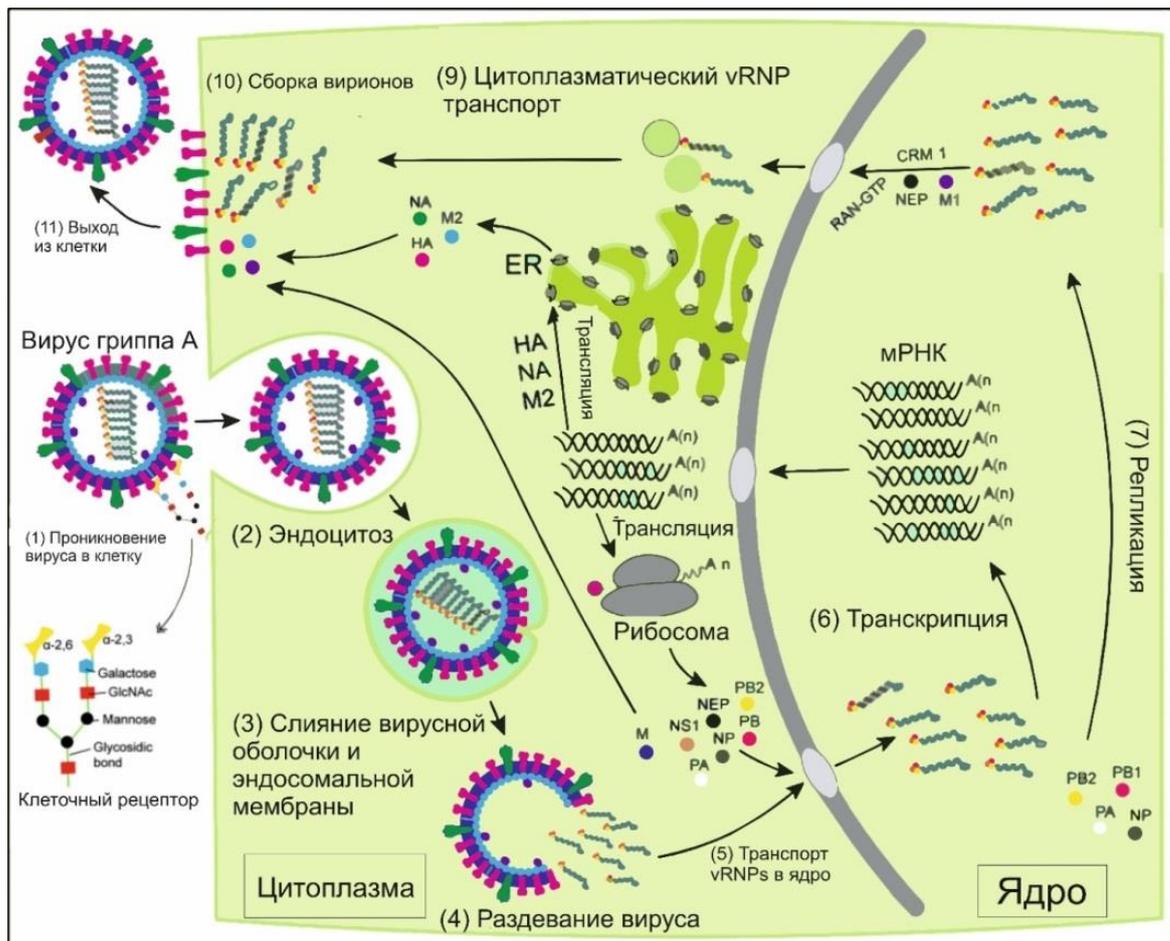


Рисунок 2. Жизненный цикл вируса гриппа А (Chauhan and Gordon, 2022).

1.4. Индукция иммунного ответа при гриппозной вирусной инфекции

Первоначально вирус поражает клетки эпителия в верхних дыхательных путях. Вирусная инфекция приводит к разрушению мерцательного эпителия, ведущему к потере способности дыхательных путей защищаться от вирусов и бактерий путем мукоцилиарного транспорта. Кроме того, репликация вируса индуцирует синтез интерферонов, цитокинов и других факторов первичного иммунного ответа, ведущих к местным и системным воспалительным ответам. Это приводит к симптомам - лихорадке, головной боли, ознобу, недомоганию, и боли в мышцах.

Гриппозная инфекция индуцирует гуморальный иммунитет, представленный в виде системного и локального иммунного ответа, а также клеточный иммунитет, который обеспечивается Т-лимфоцитами. Оба вида иммунной защиты важны при гриппозной инфекции. Кроме того, различают врожденный (неспецифический) иммунитет и адаптивный (специфический).

На ранней стадии инфекции репликация и клиренс вируса контролируются врожденной иммунной системой, которая формирует барьер первой линии на поверхности слизистых оболочек. После проникновения вируса в клетку вирусная РНК распознается рецепторами

распознавания паттернов (PRR), что влечет за собой секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также интерферонов I типа (IFN) макрофагами и дендритными клетками. IFN способен стимулировать экспрессию различных генов, которые отвечают за индукцию противовирусного состояния. Провоспалительные цитокины индуцируют местное и системное воспаление, а хемокины участвуют в привлечении дополнительных клеток иммунной системы, таких как NK-клетки, нейтрофилы и моноциты. NK-клетки ответственны за уничтожение инфицированных клеток, в то время как нейтрофилы и моноциты помогают в удалении этих мертвых клеток.

Врожденная иммунная система участвует в формировании и регуляции индукции Т-клеточных реакций в дыхательных путях после заражения. Антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как альвеолярные макрофаги и дендритные клетки, которые находятся непосредственно под поверхностью эпителия дыхательных путей, захватывают антигены гриппа и впоследствии мигрируют в лимфатические узлы, чтобы представить антиген наивным Т- и В-лимфоцитам, и Т- и В-клеткам памяти. Антиген распознается Т-клеткой только при связывании его фрагментов-продуктов протеолиза - с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). В таком виде антиген может быть распознан Т-лимфоцитами CD4+ (распознают пептиды, связанные с молекулами МНС II), либо CD8+ Т-клетками в комплексе с МНС I. Затем эти лимфоциты подвергаются поэтапному процессу активации, пролиферации и дифференцировки (Braciale *et al.*, 2012, Spitaels *et al.*, 2016) (Рис. 3).

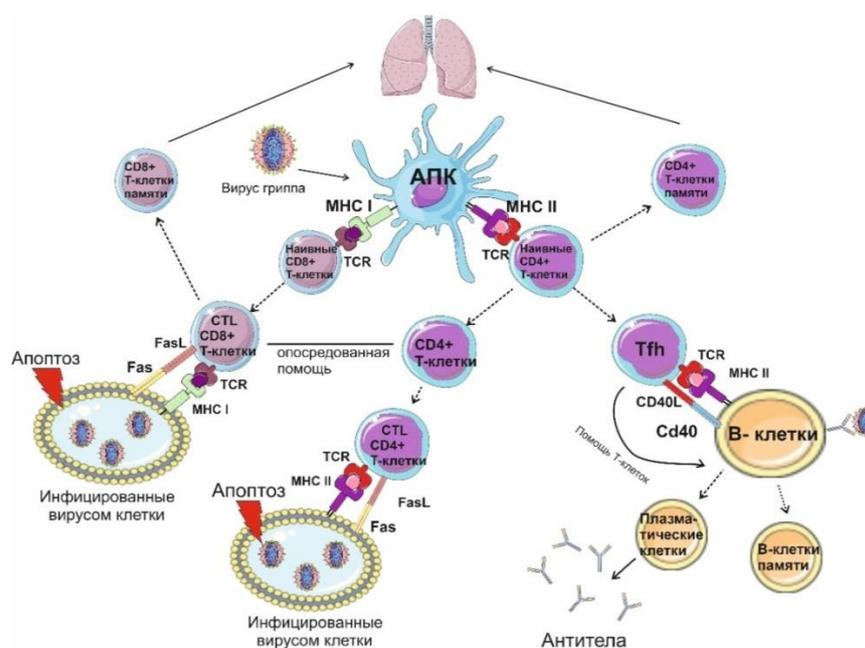


Рисунок 3. Схематическое изображение клеточных и гуморальных иммунных реакций, индуцируемых инфекцией вирусом гриппа. АПК – антигенпрезентирующие клетки; TCR – рецепторы Т-клеток; Tfh – фолликулярные Т-хелперные клетки; МНС – основной комплекс гистосовместимости. Рисунок представляет собой упрощенную схему и был разработан с использованием шаблонов изображений Servier Medical <https://smart.servier.com/>.

При гриппозной инфекции, АПК секретируют интерлейкин (IL)-12, который способствует дифференцировке Т-хелперов (Th0) в Т-хелперы 1 (Th1). А они в свою очередь секретируют IFN- γ и помогают производить IgG2a. Th1-клетки также производят IL-2, необходимый для пролиферации вирус-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLs). После активации в лимфатических узлах CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки мигрируют к месту заражения. Здесь CD8⁺ Т-клетки или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) способствуют лизису инфицированных клеток с помощью перфоринов и гранзимов или экспрессии лигандов Fas (FasL), рецепторы которых (Fas) экспрессируются на инфицированных клетках. Оба механизма приводят к апоптозу инфицированных клеток, после чего полный клиренс клеток происходит с помощью фагоцитов, такими как макрофаги и нейтрофилы (Lam and Baumgarth, 2019). CD8⁺ Т-клетки, которые часто нацелены на консервативные эпитопы внутренних белков, обеспечивают более широкую защиту от различных штаммов гриппа (Grant *et al.*, 2018). Основными вирусными антигенами, которые индуцируют CD8⁺-ответ, являются внутренние белки NP и PA (Crowe *et al.*, 2003). Напротив, CD4⁺ Т-клетки, в основном действуют опосредованно, продуцируя различные цитокины, которые поддерживают В-клетки и имеют решающее значение для того, чтобы CD8⁺ Т-клетки приобрели свою способность к цитотоксичности. Существуют различные подмножества CD4⁺ Т-клеток (Th1, Th2, Th17, фолликулярные Т-хелперные клетки (Tfh) и регуляторные Т-клетки (Treg)), которые характеризуются своими уникальными цитокиновыми паттернами и функциями. Например, клетки Tfh оказывают помощь В-клеткам, которые дифференцируются в В-клетки памяти и плазматические клетки, секретирующие высокоаффинные антитела против антигена-мишени. Инфекция вирусом гриппа индуцирует все ответы CD4⁺ Т-клеток, но наблюдается смещение в сторону ответа Th1. Основная функция Th1-клеток заключается в усилении провоспалительного клеточного иммунитета, в то время как Th2-клетки способствуют противовоспалительным иммунным реакциям.

В противоположность этому, если IL-10 присутствует в начале иммунного ответа, Th0 клетки дифференцируются в Т-хелперы 2 (Th2). Они активируют В-лимфоциты и способствуют развитию гуморального иммунного ответа, продуцируют IL-4, IL-5, IL-6. В отличие от Т-клеток, которые распознают антиген в форме презентируемой МНС, В-клетки могут распознавать антиген в нативной форме. Иммуноглобулины А (IgA) транспортируются через эпителий слизистой оболочки верхних дыхательных путей, где они представляют собой первый иммунный барьер. IgG обеспечивают защиту в нижних дыхательных путях (Renegar *et al.*, 2004). Нейтрализующие антитела, вырабатываемые В-клетками, которые в основном нацелены на эпитопы вируса гриппа, находящихся в глобулярной головке гемагглютинина, а также нейраминидазы, имеют решающее значение для предотвращения серьезных симптомов и даже

смерти после заражения. Несмотря на тот факт, что ежегодно вновь появляющиеся вирусные штаммы могут избежать этого гуморального иммунитета путем точечных мутаций в области связывания с рецептором, ранее существовавшие ненейтрализующие антитела могут играть роль в предотвращении серьезных заболеваний и/или снижении смертности путем активации антителозависимой цитотоксичности, клеточного фагоцитоза или активации системы комплемента (Sedova *et al.*, 2019).

На рисунке 4 показано, какими путями антитела могут нейтрализовать инфекцию гриппа. Было показано, что мукозальный иммунитет, опосредованный IgA в верхних дыхательных путях более сильный против гетерологичных вирусных инфекций по сравнению с системным иммунитетом, опосредованным IgG (Ichinohe *et al.*, 2008). Сильный кросс-реактивный потенциал IgA является результатом полимерной природы этого иммуноглобулина, что приводит к повышению avidности антител к вирусу гриппа по сравнению с мономерами IgG (Tamura *et al.*, 2005). Кроме того, dIgA (димерный) способен связывать вновь синтезированные вирусные белки, тем самым предотвращая сборку вирионов (Mazanec *et al.*, 1995). Анти-NA антитела вызывают агрегацию вирусных частиц, что соответственно ведет к уменьшению числа инфекционных частиц (Outlaw and Dimmock, 1993). Понимание процессов антитело-опосредованной нейтрализации дает ценную информацию о взаимодействиях вирус-клетка и помогает в разработке дизайна эффективных вакцин. Последние исследования показывают, что существуют и другие антитело-опосредованные механизмы. Существует FcR-опосредованный фагоцитоз (Huber *et al.*, 2001) и опосредованный лизис инфицированных клеток через механизм антитело-зависимой цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) (Wang *et al.*, 2008).

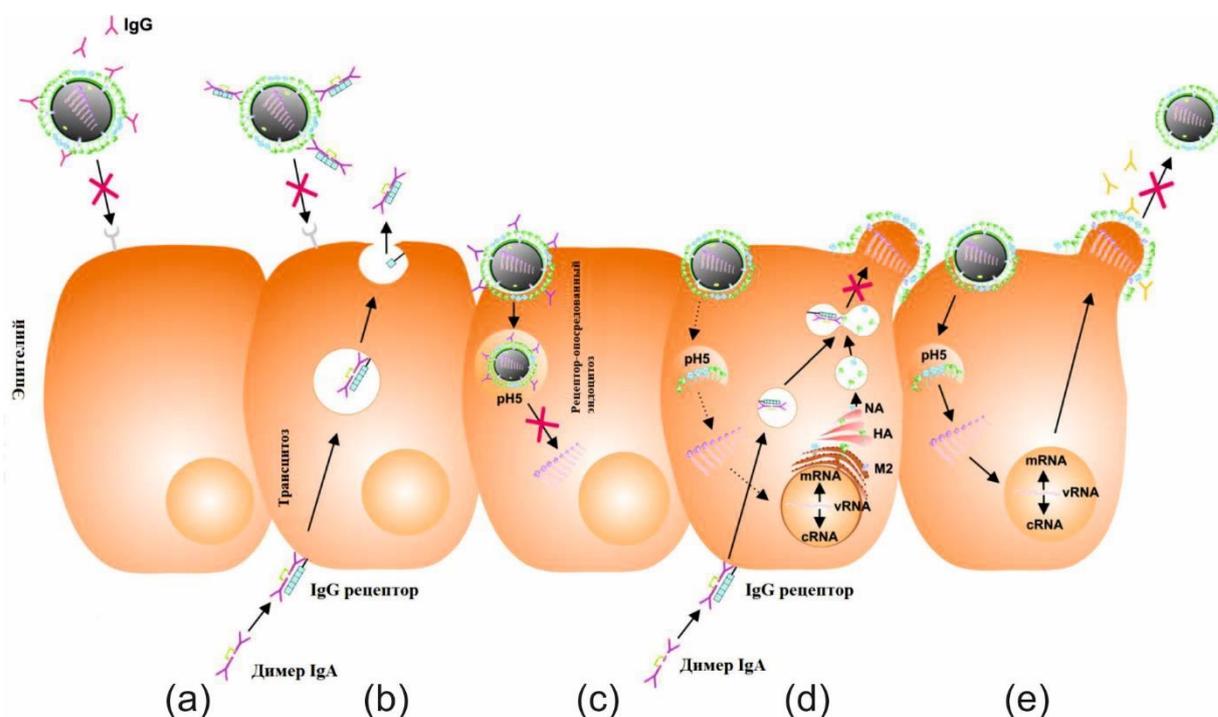


Рисунок 4. Механизмы антитело-опосредованной нейтрализации гриппозной инфекции. (а) – IgG или IgA (b) блокируют прикрепление вирусных частиц к рецепторам клеток; (с) – после проникновения, низкое значение рН в эндосоме запускает конформационные изменения гемагглютинина. На этом шаге, антитела связывают НА, блокируя слияние вирусной и эндосомальной мембраны, предотвращают выход RNP в цитоплазму клетки-мишени; (d) – внутриклеточная нейтрализация вируса гриппа с помощью связывания IgA с вирусными белками; (e) – Антитела, специфичные к нейраминидазе блокируют отпочкование вирусных частиц и дальнейшее распространение гриппозной инфекции путем ингибирования активности нейраминидазы (Stanekova and Vareckova, 2010).

После устранения первичной инфекции в легких от 90% до 95% грипп-специфичных Т-клеток подвергаются апоптозу, а оставшиеся становятся долгоживущими Т-клетками памяти. Эти клетки характеризуются высоким пролиферативным потенциалом, мультипотентным состоянием, длительной выживаемостью и способностью к самообновлению в отсутствие антигена. При повторном инфицировании эти клетки подвергаются быстрой клональной экспансии и дифференцируются во вторичные эффекторные Т-клетки, чтобы быстрее контролировать инфекцию (Spitaels *et al.*, 2016). Также при первичной инфекции формируются В-клетки памяти и обеспечивают быстрый иммунный ответ при попадании антигена повторно (Рис. 3).

2. Создание противогриппозных вакцин

Вакцинация является одной из самых успешных стратегий борьбы с различными инфекционными заболеваниями. Целью каждой вакцинации является представление конкретного антигена или набора антигенов иммунной системе, для того чтобы вызвать образование антител к ним и, тем самым, сформировать невосприимчивость к патогену.

Вакцинация является эффективным способом снижения ущерба от эпидемий и пандемий гриппа. Проблема разработки новых типов вакцинных технологий остается актуальной, так как вирус гриппа постоянно меняется, и каждый год риск возникновения эпидемии остается.

2.1. Современные противогриппозные вакцины

Все вакцины против гриппа должны ежегодно обновляться, поскольку иммунитет сохраняется лишь в течение короткого периода времени (Young *et al.*, 2018), и соответствовать антигенности циркулирующих вирусов. Таким образом, ежегодная вакцинация остается наиболее эффективным способом профилактики сезонной эпидемии гриппа.

В настоящее время во всем мире используются три типа вакцин: инактивированная вакцина против гриппа (IV), живая аттенуированная вакцина против гриппа (LAIV) и рекомбинантная вакцина. Каждый тип вакцины имеет свои преимущества и недостатки. Вакцины могут индуцировать иммунные реакции, включая гуморальный ответ (выработка антител В-лимфоцитами, которые могут специфически связываться с вирусным антигеном), и клеточный ответ (индукция цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, которые могут ограничивать распространение вируса внутри организма, убивая инфицированные клетки и CD4⁺ Т-лимфоцитов, оказывающих опосредованную функцию).

Инактивированные вакцины. Инактивированные вакцины получают путем выращивания вируса в куриных эмбриональных яйцах. Такой тип вакцины является наиболее популярным в мире из-за относительно низких производственных затрат и высокой безопасности. Вакцинация инактивированными вакцинами начинается в возрасте 6-12 месяцев. Существует три типа инактивированных вакцин: цельновирионные вакцины, расщепленные вирионные вакцины и субъединичные вакцины. Цельновирионную вакцину получают путем очистки вирионов, которые были химически инактивированы формальдегидом или β-пропиолактоном. В вакцине с расщепленным вирионом вирусная оболочка разрушается диэтиловым эфиром или обработкой детергентом. Субъединичные вакцины содержат только вирусные белки гемагглютинин и нейраминидазу. Несмотря на более низкую иммуногенность и узкий спектр защиты, расщепленные вирионные и субъединичные вакцины используются чаще, чем цельновирионные вакцины. Помимо недолгого иммунитета, еще одной ключевой проблемой для инактивированных вакцин является то, что вирус гриппа А, особенно штамм А/Н3N2 требует большого количества пассажей в куриных эмбрионах для достижения высоких титров, потому что исходные изоляты там плохо размножаются. Такие чрезмерные пассажи могут изменять антигенность гемагглютинина, что влечет за собой антигенное несоответствие с эпидемическими изолятами (Wu *et al.*, 2017). Эту проблему решают с помощью использования культивируемых клеточных линий для размножения вируса. Однако, титры вируса, выращенного в таких «искусственных» условиях, низкие, что влечет за собой повышение

стоимости производства. Поэтому использование инактивированных сезонных вакцин на основе клеточных культур ограничено.

Живые ослабленные вакцины (аттенуированные). Живые аттенуированные вакцины доступны в США, Канаде и нескольких европейских странах. Поскольку живые ослабленные вакцины имитируют естественную инфекцию, не вызывая серьезных побочных реакций, они могут вызывать сильный иммунный ответ. Но такой тип вакцины тоже имеет минусы. Главный минус - это антигенная изменчивость и неполное аттенуирование при производстве. Эти события могут привести к появлению нового пандемического штамма вируса. Поэтому производство и использование живых вакцин необходимо всегда держать под пристальным контролем. Живая ослабленная вакцина не рекомендуется для использования у детей младше 2 лет, для беременных женщин и людей с определенными сопутствующими заболеваниями или ослабленной иммунной системой. Живая аттенуированная вакцина против гриппа на основе адаптированных к холоду вирусных штаммов используется и в России («Ультравак»).

Рекомбинантные вакцины на основе гемагглютинина. Такой тип вакцины производится с помощью систем, экспрессирующих рекомбинантный белок, с использованием бакуловирусных векторов и клеток насекомых. В состав вакцины входит рекомбинантный белок гемагглютинина. Преимуществом является то, что такой тип вакцин подходит людям с аллергией на яичный белок (Grohskopf *et al.*, 2018). Кроме того, рекомбинантная вакцина может быть изготовлена в течение 2 месяцев. Это важное преимущество для использования в качестве профилактики против пандемических вирусов гриппа. Но минусом является то, что необходимо часто обновлять состав вакцины, в связи с изменением белка гемагглютинина в сезонных и пандемических штаммах. Инактивированные вакцины против вируса гриппа и рекомбинантные вакцины на основе НА имеют сходный механизм действия, но рекомбинантная вакцина менее иммуногенна и, следовательно, требует применения большей дозы, чтобы индуцировать такие же титры антител, что и при применении инактивированной вакцины (Сох *et al.*, 2008). Из-за недостаточной эффективности у детей рекомбинантная вакцина на основе НА предназначена только для взрослых (Gutierrez and Sahly, 2015). Такой первой вакциной является Flublok, производства компании Санофи Пастер.

На данный момент в России используется несколько живых аттенуированных вакцин и разные типы инактивированных вакцин. Они являются трехвалентными, то есть содержат антигены трех штаммов вируса гриппа. Например, вакцины Гриппол Нео, Ультрикс, Совигрипп. В настоящее время в мире циркулируют две линии вируса гриппа В, поэтому в последних рекомендациях ВОЗ предлагается добавить второй штамм вируса гриппа В к двум штаммам вируса гриппа А и одному штамму вируса гриппа В для получения четырехвалентной вакцины. Это предполагает обеспечение более широкой защиты от нескольких вирусов гриппа.

В России такими примерами являются вакцины Гриппол Квадривалент, Ультрикс Квадри. Для каждого типа вакцин характерны свои недостатки, которые необходимо устранять или обходить в будущем для повышения эффективности защиты.

Таблица 2. Вакцины против вирусов гриппа, используемые в России.

Название	Тип	Валентность	Способ введения	Адьювант	Страна - производитель
Инфлювир	Живая аттенуированная	1 (А)	Интраназально	-	Россия
Ультравак	Живая аттенуированная	3 (А, А, В)	Интраназально	-	Россия
Ваксигрипп	Инактивированная цельновирсионная	3 (А, А, В)	Внутримышечно или подкожно	-	Франция
Ультрикс	Инактивированная расщепленная	3 (А, А, В)	Внутримышечно	-	Россия
Ультрикс квадри	Инактивированная расщепленная	4 (А, А, В, В)	Внутримышечно	-	Россия
Инфлювак	Инактивированная субъединичная	3 (А, А, В)	Внутримышечно или подкожно	-	Нидерланды
Гриппол Нео	Инактивированная субъединичная	3 (А, А, В)	Внутримышечно или подкожно	Полиоксидоний	Россия
Гриппол Квадривалент	Инактивированная субъединичная	4 (А, А, В, В)	Внутримышечно или подкожно	Полиоксидоний	Россия
Совигрипп	Инактивированная субъединичная	3 (А, А, В)	Внутримышечно	Совидон	Россия
Флю-М	Инактивированная субъединичная	3 (А, А, В)	Внутримышечно	-	Россия

Современная вакцина против гриппа, обладающая способностью индуцировать широкий длительный защитный иммунный ответ, предпочтительно с гетеросубтипной защитой является необходимой потребностью для общественного здравоохранения.

2.2. Универсальные противогриппозные вакцины

Было предпринято множество стратегий по разработке универсальной вакцины против гриппа. Индукция перекрестных защитных иммунных реакций, направленных на консервативные эпитопы В-клеток или Т-клеток, является основным принципом, лежащим в основе широкой защиты. Некоторые консервативные вирусные антигены, такие как внеклеточный домен М2 (М2е), участок стебля гемагглютинаина НА, участок нейраминидазы NA и эпитопы Т-клеток во внутренних белках, таких как РВ1, нуклеопротеина NP и матриксного белка М1 могут быть мишенями для индукции перекрестно-реактивного иммунного ответа.

2.2.1. Универсальные вакцины на основе M2e

Вирус гриппа А имеет два основных поверхностных белка, HA и NA, и один второстепенный поверхностный белок, который формирует ионные каналы - M2. Матричный белок 2 является интегральным мембранным белком III типа (по номенклатуре von Heijne) (Heijne, 1986). Он формирует ионный канал, который активируется при низких pH (Mould *et al.*, 2000) и является специфической целью для противогриппозных препаратов амантадина и ремантадина. Эти ингибиторы влияют на двух стадиях жизненного цикла вируса: раздевание вируса и созревание. Низкое значение pH способствует белок-белковой диссоциации матричного белка и RNP, в результате чего происходит выход вирусных RNP в цитоплазму клетки хозяина (Pinto *et al.*, 1992).

Внеклеточный домен белка M2 (M2e) состоит из 23 аминокислот. В 2005 году была проанализирована эта последовательность у 716 штаммов вирусов гриппа А, выделенных от различных хозяев (человек, птица, свинья и др.). В результате было установлено, что 17 из 23 а.о. являются консервативными (Liu *et al.*, 2005) (Таблица 3). Таким образом, консервативность внеклеточного домена белка M2 позволяет рассматривать его в качестве перспективной мишени для разработки универсальных вакцин против вирусов гриппа А, способных обеспечить широкий спектр защиты.

Таблица 3. Последовательности M2e штаммов вируса гриппа человека.

Штамм вируса гриппа	Субтип	Аминокислотная последовательность внеклеточного домена M2 белка
<i>Консенсусная последовательность</i>		SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/FM/1/47-MA	H1N1	SLLTEVETPTKNEWECRCNDSSD
A/Berkely/1/68	H2N2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Aichi/2/68	H3N2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Moscow/346/2003	H3N2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Darwin/9/2021	H3N2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSN
A/Hong Kong/156/97	H5N1	SLLTEVETL TR NGWGCRCSDSSD
A/Vietnam/1203/04	H5N1	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD
A/Hong Kong/1073/99	H9N2	SLLTEVETL TR NGW E CKCRDSSD

Низкая иммуногенность M2e требует использование носителей и/или адъювантов для усиления иммунных ответов. Одним из наиболее эффективных подходов является создание вирусоподобных частиц (VLP), которые несут M2e на своей поверхности. Было показано, что основной белок вируса гепатита В (HBc), генетически слитый с M2e, самособирается в вирусоподобные наночастицы, представляющие около 240 копий M2e на поверхности (Neiryneck

et al., 1999). После этой работы были предприняты различные попытки по улучшению иммуногенности и защитной эффективности таких вирусоподобных частиц. Основные стратегии включают увеличение числа копий М2е с помощью тандемных повторов (Ravin *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2015) и комбинации с адьювантами, такими как субъединица холерного токсина А1 (De Filette *et al.*, 2006) или В-субъединица термолabileного энтеротоксина *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2009). Есть работы, в которых вирусоподобные частицы на основе НВс, несущие М2е, были дополнительно усложнены Т-клеточным эпитопом из нуклеопротеина для выработки также Т-клеточного иммунитета (Gao *et al.*, 2013).

Помимо НВс, М2е был слит с различными белками оболочки или капсида, полученными из других вирусов, включая вирус табачной мозаики (Petukhova *et al.*, 2013), вирус мозаики мальвы (Leclerc *et al.*, 2013), бактериофаг Т7 (Hashemi *et al.*, 2012) и РНК-содержащий фаг Q β (Bessa *et al.*, 2008). Но часто вставка в ту или иную область молекулы нарушает сборку капсида и образование вирусоподобных частиц, отрицательно влияет на стабильность, хранение. Это является серьезным препятствием для создания препаратов.

Проведенные исследования показали механизмы перекрестной защиты, обеспечиваемой вакцинами на основе М2е (Jegerlehner *et al.*, 2004, El Bakkouri *et al.*, 2011). Главным является то, что антитела, специфичные к М2е, не могут непосредственно нейтрализовать вирусы, но они способны вызывать другие иммунные реакции, опосредованные антителами и клетками. В отличие от гемагглютинина (НА), М2е белок в структуре вириона не доступен для связывания с антителами. Однако, М2е-специфические антитела способны взаимодействовать с клетками, инфицированными вирусом гриппа, на поверхности которых М2 присутствует в значительном количестве. Связывание этих антител с М2е на клетках-мишенях вызывает активацию антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (Huber *et al.*, 2001), а также комплемент-зависимой цитотоксичности. Кроме того, М2е-специфические антитела активируют гибель инфицированных клеток с помощью натуральных киллеров (НК). Эти исследования в совокупности предполагают, что М2е-специфические антитела играют решающую роль в широкой защите от вируса гриппа А за счет их способности элиминировать инфицированные клетки, не допуская репликации и распространения вируса.

Сложной задачей остается преодоление недостаточной защитной эффективности вакцин на основе М2е из-за проблемы низкой иммуногенности антигена и низкого содержания белков М2 в вирионах гриппа. С клинической и практической точек зрения многократная иммунизация высокой дозой вакцинных антигенов в сочетании с сильнодействующими адьювантами может представлять угрозу безопасности, что делает подходы к вакцинации на основе М2е несостоятельными в качестве самостоятельного препарата. Решением могло бы быть объединение антигена М2е с другими вирусными антигенами гриппа или с штамм-

специфичными вакцинами. Это могло бы привести к повышению эффективности и более широкой перекрестной защите. Например, в нескольких исследованиях M2e сочетался с доменом головки или стебля HA вируса гриппа, чтобы вызвать широкий защитный иммунитет с использованием различных платформ, включая наночастицы (Guo *et al.*, 2017, Bernasconi *et al.*, 2018, Deng *et al.*, 2018, Цыбалова и др., 2017). Была исследована дополнительная вакцинация M2e для преодоления специфической для штамма защиты или низкой иммуногенности классических инактивированных или расщепленных вакцин (Music *et al.*, 2016, Song *et al.*, 2016).

2.2.2. Универсальные вакцины на основе консервативных областей гемагглютинина

Гемагглютинин вируса гриппа является основным антигеном-мишенью сезонной вакцины в настоящее время. Однако вакцины на основе HA обеспечивают только штамм-специфическую защиту от гомологичных вирусов, что требует ежегодного обновления состава вакцин для соответствия циркулирующим вирусным штаммам. HA состоит из двух доменов: шаровидной головки и стеблевого домена. Так как головной домен иммунологически доминантен, то большинство антител на HA направлено на него. Также он и сильно вариабелен. Напротив, стеблевой домен HA относительно консервативен среди вирусов, и поэтому индукция образования антител, специфичных к стеблевой части, рассматривается как ключ к разработке вакцин с широким спектром действия. Однако этот домен обычно рассматривается как иммунологически субдоминантный из-за маскирующего эффекта за счет домена головки и непосредственной близости к вирусной мембране (Krammer, 2019).

Основной функцией антител к участкам стеблевого домена является ингибирование слияния мембран. Связывание антител со стеблевым доменом прерывает конформационное изменение HA и предотвращает последующее слияние мембран (Ekiert *et al.*, 2009). Более того, связывание стеблевого домена антителами блокирует доступ протеаз к участку расщепления, расположенному в этой области, и предотвращает протеазозависимое расщепление предшественника HA на субъединицы HA1 и HA2, что является предпосылкой для изменения конформации HA (Ekiert *et al.*, 2009). Эти две перекрывающиеся функции стебель-реактивных антител приводят к ингибированию слияния мембран и прямой нейтрализации вируса. В дополнение к этим механизмам, антитела к стеблю могут также связываться с недавно экспрессируемыми белками HA на поверхности клетки и препятствовать почкованию или высвобождению вируса на более поздней стадии инфекции (Tan *et al.*, 2014). Активность антител к участкам стеблевого домена может привести к нейтрализации вирусов гриппа, хотя нейтрализующая активность таких антител слабее, чем у антител к участкам головного домена HA, которые непосредственно препятствуют связыванию вируса с рецептором клетки. Помимо

нейтрализующей активности антитела к стеблевому домену способны участвовать в таких механизмах защиты как антитело- и комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность для удаления инфицированных вирусом клеток из организма посредством NK-клеток и макрофагов (DiLillo *et al.*, 2014, Ana-Sosa-Batiz *et al.*, 2016).

Также такие антитела ингибируют ферментативную активность NA через стерические помехи, ограничивая ей доступ к NA-связанной сиаловой кислоте, тем самым предотвращая выход вируса (Kosik *et al.*, 2019). В целом, антитела к стеблевому участку обеспечивают широкую защиту от заражения вирусом гриппа посредством множества механизмов, воздействующих как на NA, так и на NA на протяжении всего инфекционного цикла вируса гриппа. Т-клеточный иммунитет против консервативных участков стеблевого домена также обеспечивает широкую защиту. Перекрестно-реактивные цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) распознают вирусные эпитопы, представленные АПК, и убивают инфицированные клетки.

Чтобы преодолеть низкую иммуногенность участков стеблевого домена NA были применены разные подходы. Например, были разработаны «безголовые» NA, у которых отсутствует головной домен, для усиления выработки антител именно к стеблевому участку (Steel *et al.*, 2010). Но удаление головного домена часто приводило к неправильному свертыванию стеблевого домена, что делало нейтрализующие эпитопы неэффективными. Последующие исследования были проведены для получения нативной структуры с помощью рационализации конструкций, имитирующих нативную тримерную конформацию (Impagliazzo *et al.*, 2015).

Второй подход к индукции антител к стеблевому домену основан на создании химерного NA, который состоит из стеблевого домена, полученного из основных штаммов-мишеней, таких как вирусы H1, H3, слитых с головным доменом птичьих штаммов вирусов, таких как H5, H6 или H8 (Krammer and Palese, 2015). Химерный подход NA предполагает использование полноразмерного функционального белка NA.

Третий подход основан на гипергликозилировании головного домена NA. Введение дополнительных сайтов N-гликозилирования в иммунодоминантный головной домен закрывает основные антигенные сайты в этом домене и перенаправляет иммунный ответ с головного домена на стебелевой (Krammer and Palese, 2015).

Так как стебелевой домен менее иммуногенен, чем головной, и антитела к нему менее эффективны в нейтрализации вируса, чем антитела к головному домену, то для индукции достаточного защитного уровня антител требуется многократная иммунизация вакцинами на основе стеблевого домена NA.

2.2.3. Т-клеточный иммунитет как важнейший фактор эффективности защиты от гриппа

Подавляющее большинство усилий по разработке вакцин с широким спектром действия сосредоточено на индукции иммунного ответа в виде антител к поверхностным гликопротеинам: M2e, HA, NA. Однако помимо гуморального иммунитета для формирования широкой защиты от инфекции гриппа важен и Т-клеточный иммунитет (Sridhar, 2016, Clemens *et al.*, 2018). Т-клеточный иммунитет против вирусов гриппа не является нейтрализующим, но он способен облегчить тяжесть заболевания и уменьшить длительность инфекционного периода, способствуя быстрому выздоровлению (Sridhar, 2016). Для обеспечения действительно универсальной защиты от высоковариантных вирусов гриппа необходима индукция разнообразных иммунных реакций, как гуморальных, так и Т-клеточных.

Известно, что Т-клеточный иммунитет обладает высокой перекрестной реакцией за счет распознавания консервативных пептидов между различными подтипами вирусов гриппа (Lee *et al.*, 2008, van de Sandt *et al.*, 2014). Обширные исследования на различных моделях животных доказали, что защитная роль вакцинации связана с образованием цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов (Kreijtz *et al.*, 2009, Vodewes *et al.*, 2011). Большинство перекрестно-реактивных Т-клеточных эпитопов вируса гриппа находятся во внутренних белках, что неудивительно, учитывая то, что последовательность внутренних белков медленнее меняется эволюционно. Ряд CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточных эпитопов высококонсервативны у внутренних белков (Terajima *et al.*, 2013).

Несколько вакцин-кандидатов на основе Т-клеточных эпитопов находятся на разных стадиях клинической разработки (Sridhar, 2016). Эти вакцины представляют собой рекомбинантные белки, вирусоподобные наночастицы, ДНК-вакцины, реплицирующиеся и нереплицирующиеся вирусные векторы. Примером могут быть вирусоподобные частицы, полученные с помощью бакуловиральной экспрессионной системы, несущие пептиды HA, NA и M1 вируса гриппа H1N1. Интраназальная иммунизация мышей BALB/c этими частицами обеспечивала интенсивную индукцию Т-клеточного ответа (Keshavarz *et al.*, 2019). Другим примером являются модифицированные векторы MVA (вирус осповакцины Анкары), экспрессирующие NP, которые способны защитить мышей от летального заражения вирусами H5N1, H7N1 и H9N2 с помощью механизма, включающего специфичные для гриппа ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (Hessel *et al.*, 2014).

Многообещающим антигеном для разработки универсальной вакцины могут быть консервативные фрагменты нуклеопротеина (NP). Белок NP консервативен в вирусах гриппа А, с разницей в аминокислотных последовательностях менее 11% (Shu *et al.*, 1993). Он является мишенью для перекрестно-реактивного ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) на вирусы гриппа А (Yewdell *et al.*, 1985, Townsend *et al.*, 1985). Индукция CTL важна для выздоровления от гриппозной инфекции, так как удаляются инфицированные вирусом клетки и

прерывается цикл размножения вируса (Brown and Kelso, 2009). Благодаря консервативности последовательности и индукции широкого NP-специфического иммунитета, NP привлекателен для разработки универсальной вакцины против гриппа. Фрагменты NP были использованы в нескольких универсальных вакцинах-кандидатах на разных стадиях клинических испытаний (III фаза КИ: Multimeric-001 (M-001), II фаза: FLU-v, I фаза: FP-01.1) (согласно базе данных Universal Influenza Vaccine Technology Landscape). В рекомбинантной вакцине Multimeric-001, включены 3 эпитопа белка NP: Th эпитоп и 2 CTL эпитопа (335-350 а.о. и 380-393 а.о.). В состав пептидной вакцины FLU-v входит консенсусная последовательность NP белка для вирусов гриппа А (255-275 а.о.) и В (307-325 а.о.) (Romeli *et al.*, 2020). Показана безопасность и эффективность этих вакцин, а также их способность индуцировать NP специфический Т-клеточный ответ (Van Doorn *et al.*, 2017, Pleguezuelos *et al.*, 2012). Комбинация нескольких консервативных антигенов, которые вместе могут вызывать иммунный ответ, опосредованный антителами и клетками, против широкого спектра вирусов гриппа, была бы предпочтительной для разработки вакцины с широким спектром действия.

Хорошо известно, что CD4⁺ Т-клетки играют важную роль в организации противовирусного иммунитета, а также в иницировании и поддержании эффекторных функций CD8⁺ Т-клеток. Однако, использование синтетических пептидов и рекомбинантных белков для создания эффективных вакцин сталкивается с рядом проблем, таких как отсутствие согласованных эпитопов Т-хелперов, распознаваемых CD4-Т-клетками человека у индивидуумов, экспрессирующих различные аллели МНС класса II. Чтобы преодолеть проблему полиморфизма HLA в человеческой популяции, был разработан простой Т-клеточный хелперный эпитоп, обозначенный как pan HLA DR-связывающий эпитоп (PADRE) (Alexander *et al.*, 1994). PADRE - универсальный синтетический пептид из 13 аминокислот, активирующий CD4⁺ Т-клетки. Поскольку PADRE имеет высокое сродство к 15 из 16 наиболее распространенных типов HLA-DR человека и умеренное или высокое сродство к мышинным I-Ab/d и I-Eb/d МНС-гаплотипам, он обеспечивает эффективные ответы CD4⁺ Т-клеток. Вероятно, PADRE может преодолеть проблемы, вызванные полиморфизмом молекул HLA-DR в популяции (Agadjanyan *et al.*, 2005). Исследования *in vitro* показали, что PADRE индуцирует пролиферативный Т-клеточный ответ индивидуумов с различными HLA-аллелями (Alexander *et al.*, 1994). Анализ на пролиферацию показал, что PADRE в 100 раз более эффективен, чем другие универсальные Т-хелперные эпитопы, например, универсальный эпитоп, полученный из столбнячного токсина (Alexander *et al.*, 2000). Кроме того, клинические исследования на людях показали, что PADRE является безопасным и хорошо переносимым (Weber *et al.*, 1999). PADRE активно изучается для создания рекомбинантных или синтетических вакцин для человека (Decroix *et al.*, 2002, Vichier-Guerre *et al.*, 2003, Ghaffari-Nazari *et al.*, 2015). Например, его

наличие значительно увеличивает гуморальный иммунный ответ, индуцированный вакциной против рекомбинантного малярийного антигена (Rosa *et al.*, 2004). Другим примером является исследование вакцинного кандидата против папилломавирусов человека на основе пептида E7 в комбинации с PADRE и агонистом Toll-подобного рецептора 3 (TLR3), которое показало лучшие ответы CTL и противоопухолевую защиту, чем вакцина без Т-хелперного эпитопа (Wu *et al.*, 2010).

3. Вакцинные платформы, используемые для разработки универсальных вакцин-кандидатов против гриппа

Консервативные антигены вируса гриппа имеют слабую иммуногенность и требуют использования специальных носителей и/или адъювантов, которые увеличивали бы их иммуногенность за счет своих иммуoadъювантных свойств, а также возможности презентации антигена в высокой плотности на своей поверхности. В настоящее время существует несколько подходов к созданию универсальных вакцин против гриппа.

Одним из подходов к проектированию вакцин с широким спектром действия является использование иммуногенных консервативных эпитопов. Это минимальный компонент, который активирует лимфоциты: короткие пептиды из 8-10 аминокислот для активации Т-клеток и более длинные последовательности до 20 аминокислот для активации В-клеток (Rotzschke *et al.*, 1991).

Однако существуют проблемы, связанные с пептидными вакцинами, в первую очередь низкая иммуногенность по сравнению с «цельнопатогенными» вакцинами и необходимость надежных и простых методов оценки Т-клеточного ответа. С другой стороны, заметным преимуществом вакцин на основе пептидов является широкий спектр вариантов их производства. Например, смесь синтетических пептидов может быть получена химическим путем, или полиэпитопный продукт может быть получен в виде рекомбинантного белка с использованием различных систем экспрессии.

Примером таких вакцин является рекомбинантные белки на основе четырех tandemных копий M2e, слитые с С-концом флагеллина (Степанова и др., 2018). Кроме того, был разработан аналогичный белок с дополнительной вставкой консервативного фрагмента гемагглютинина HA2 (Цыбалова и др., 2017).

Универсальные вакцины против гриппа на основе вирусоподобных частиц (VLP)

Важным при создании вакцин является и фактор поглощения антигенов антиген-презентирующими клетками. Он зависит от нескольких антиген-связанных свойств, таких как размер, форма, поверхностный заряд, гидрофобность и гидрофильность антигена, а также от рецепторных взаимодействий. Размер антигенов является важным фактором их эффективного

поглощения АПК. Антигены, такие как вирусомы, вирусоподобные частицы или антигены, связанные с адъювантами, имеют большую поверхность, которая заряжена, гидрофобна или обладает рецептор-взаимодействующими свойствами. Это приводит к лучшему взаимодействию АПК с частицами, чем с растворимыми белками. Было показано, что активация АПК связана с размером поглощаемых частиц (Bachmann and Jennings, 2010). Таким образом, в отличие от небольших белковых антигенов, которые неэффективно воспринимаются и презентуются АПК, белковые агрегаты или наноразмерные частицы могут эффективно взаимодействовать с АПК и активировать их иммунный ответ.

Многие вирусные структурные белки обладают способностью к самосборке в вирусоподобные частицы, которые имитируют структуру нативных вирусов, но лишены вирусного генома. VLP зарекомендовали себя как универсальная, безопасная и высокоиммуногенная платформа для вакцин благодаря присущим им иммуногенным свойствам. Например, ядерный антиген вируса гепатита В (НВсAg) может образовывать VLP и нести на поверхности чужеродные антигены (Neirynck *et al.*, 1999). VLP могут быть получены в клетках бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих и даже в растениях. Платформы для производства VLP на растительной основе предлагают множество преимуществ, таких как низкая стоимость, высокая безопасность, надлежащая посттрансляционная модификация и высокая масштабируемость (Hemmati *et al.*, 2022). Вакцина-кандидат QVLP, разработанная компанией Medicago, в которой используются VLP, полученные в растениях *Nicotiana benthamiana*, несущие антигены НА, обеспечила защиту от заболеваний, вызываемых вирусами гриппа у взрослых, и прошла III стадию клинических испытаний (Ward *et al.*, 2020).

Универсальные вакцины против гриппа на основе наночастиц, отличных от VLP

Сборка белков в наночастицы оказалась многообещающей для представления иммуногенов антиген-презентирующим клеткам и запуска реакций В- и Т-клеток на инфекционные агенты. В настоящее время в клинических испытаниях находятся несколько универсальных вакцин против гриппа, основанных на платформах наночастиц, отличных от вирусоподобных. Примерами являются самособирающиеся частицы на основе ферритина, несущие консервативные последовательности стеблевого домена НА (Corbett *et al.*, 2019). В настоящее время также разрабатывается вакцина-кандидат на основе наночастиц из пентамерной люмазин-синтазы, FluMos-v1, которая индуцирует защитную реакцию антител против широкого спектра вирусов гриппа (Boyoglu-Barnum *et al.*, 2021). Nano-Flu, вакцина-кандидат на основе наночастиц, покрытых полисорбатом-80, для доставки антигена гемагглютиниона, вызывает индукцию гуморального и клеточного иммунного ответа (Shinde *et al.*, 2022).

Кроме того, существует множество доклинических исследований, посвященных разработке универсальных вакцин против гриппа на основе платформ из наночастиц, отличных от вирусоподобных. В большинстве из них используются консервативные антигены вируса гриппа, такие как M2e, NP и стеблевой домен HA. Сами частицы представляют собой липосомы, самособирающиеся наночастицы, дендримеры. Применение таких новых платформ является перспективным и играет большую роль в разработке универсальной вакцины против гриппа.

4. Наночастицы на основе искусственных самособирающихся пептидов как носители антигенов

Самосборка — это способность некоторых молекул спонтанно собираться в упорядоченные структуры. Примерами такой сборки являются капсиды вирусов, клеточные мембраны, клеточный цитоскелет. В основе самосборки лежит образование стабильной структуры с более низким уровнем энергии. Примерами самоорганизующихся частиц являются белки вирусов, такие как капсид вируса табачной мозаики (TMV) (Orlov *et al.*, 2001) и ядерный антиген вируса гепатита В (HBcAg) (Burrell *et al.*, 1979). Молекулярная инженерия белков как мономерных строительных блоков через самосборку была впервые предложена Дрекслером в 1981 году (Drexler, 1981). С тех пор самособирающиеся пептиды стали использоваться для получения широкого спектра материалов, таких как нановолокна (Zhang, 2003), нанопроволки (Sun *et al.*, 2016), наночастицы (Kaba *et al.*, 2009, Raman *et al.*, 2006) и др.

4.1. Coiled Coil мотив для получения самособирающихся структур

Создание сложных структур посредством высокоупорядоченных повторений ограниченного числа строительных блоков является особенностью самосборки (Lakshmanan *et al.*, 2012). Первичная и вторичная структуры пептидов определяют их свойства для самосборки (Yang *et al.*, 2012). Наиболее распространенными в природе мотивами, способствующими олигомеризации, являются α -спирали (Burkhard *et al.*, 2001). Они являются удобными строительными блоками для проектирования самособирающихся материалов за счет их стабильности и четко определенных структур (Yang *et al.*, 2012).

Существует много работ, свидетельствующих о важной роли α -спиралей во внутрибелковых и межбелковых взаимодействиях (Mason and Arndt, 2004, Indelicato *et al.*, 2016). Суперспирализованные участки (Coiled-coil домен) являются основой для многих сложных конструкций. Такая структура представляет отличную основу для построения самособирающихся элементов по нескольким причинам. В первую очередь, несмотря на одинаковую структуру в спиральных, суперспирали демонстрируют необычное богатство своей структуры и своих функций. Во-вторых, больше прослеживается связь между аминокислотной

последовательностью и вторичной структурой, чем в других мотивах. В-третьих, изучены механизмы конструирования таких структур, что привело к множеству успешных разработок Coiled Coil.

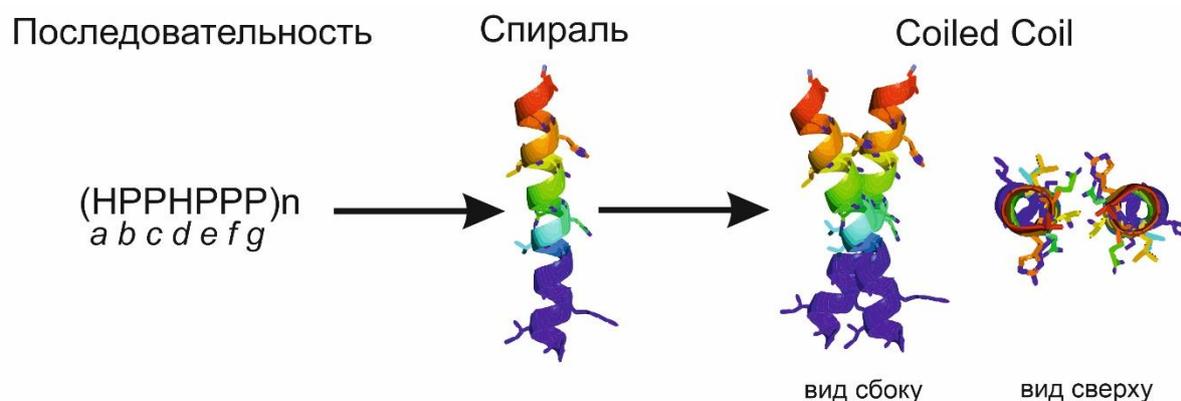


Рисунок 5. Принцип образования Coiled-coil домена. Гептадные повторы гидрофобных и полярных аминокислотных остатков приводят к образованию амфипатических спиралей. Гидрофобные грани двух или более таких спиралей затем скручиваются, образуя Coiled Coil. Взаимодействие осуществляется через аминокислоты в положениях a, d, e, g (показаны в виде палочек), другие аминокислоты в положении b, c, f свободны. Визуализация PyMOL.

Основные принципы суперспирализации, ее возникновение и сворачивание представлены на рисунках 5 и 6. По сути, большинство таких структур основано на гептадном повторе, который имеет 7 остатков, часто именуемых abcdefg. Позиции 1 и 4 часто заняты гидрофобными (H) аминокислотами, остальные – полярными (P). Итоговая последовательность (HRRHPPP) создает возможность создания амфипатической альфа-спирали. В воде две или более спиралей могут комбинироваться, взаимодействуя между собой, чтобы спрятать свое гидрофобное ядро, а заряженные аминокислоты в определенных позициях дополнительно стабилизируют формирующуюся суперспирализацию (Apostolovic *et al.*, 2010) (Рис. 6).

В природе наблюдается большое разнообразие Coiled Coil структур (варьируется количество спиралей в мотиве и их топология (относительная ориентация спиралей)) (Рис. 7). Это дает широкий диапазон для различного применения спиралей.

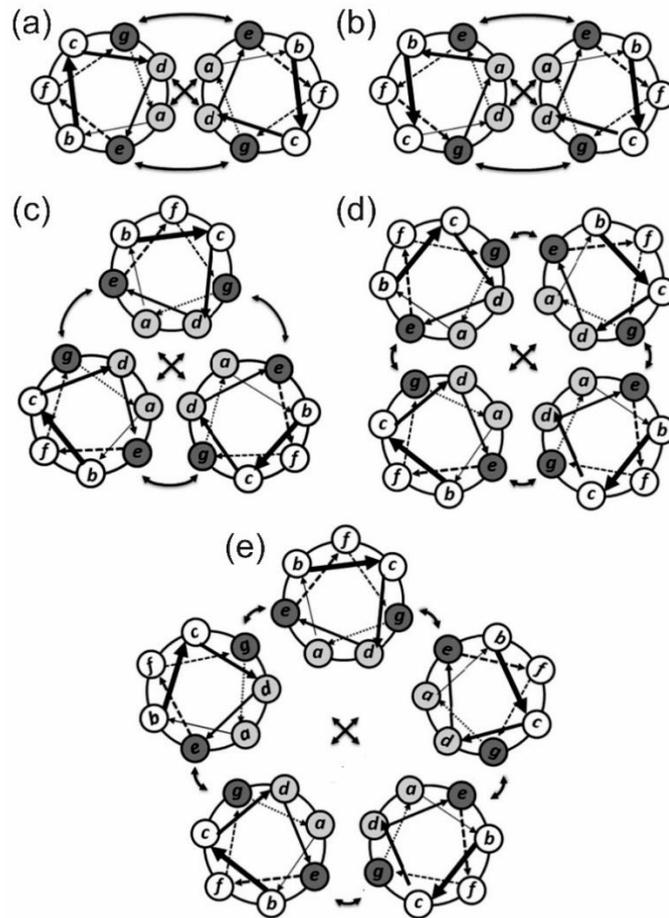


Рисунок 6. Схемы образования Coiled Coil. (a) Параллельный димерный Coiled Coil домен; (b) Антипараллельный димерный Coiled Coil домен; (c) Тримерный Coiled Coil домен; (d) Тетрамерный Coiled Coil домен; (e) Пентамерный Coiled Coil домен. Изогнутые стрелки указывают на солевые мостики, а скрещенные стрелки - на гидрофобные взаимодействия (Apostolovic *et al.*, 2010).

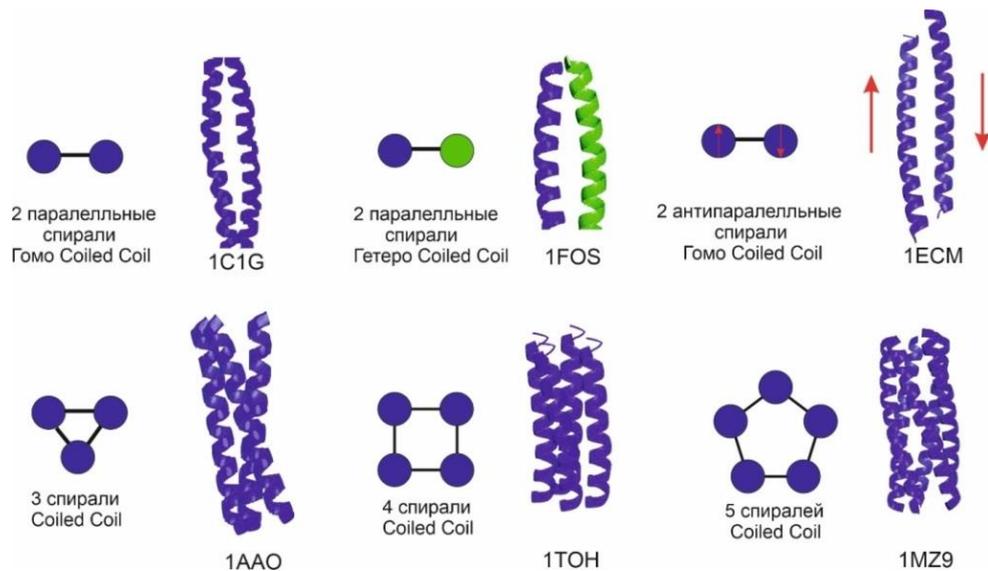


Рисунок 7. Примеры Coiled Coil доменов. Визуализация сделана в программе PyMOL. Идентификаторы белков в PDB: 1C1G (Whitby and Phillips, 2000), 1FOS (Glover *et al.*, 1995), 1ECM (Lee *et al.*, 1995), 1AA0 (Tao *et al.*, 1997), 1TON (Goodwill *et al.*, 1997), 1MZ9 (Ozbek *et al.*, 2002).

Использование методов биоинформатики дает возможность создания *de novo* структур Coiled-coil с определенными свойствами, поскольку большое значение имеет первичная структура белка (Harbury *et al.*, 1993). Такие структуры находят применение в качестве строительных блоков для разработки самособирающихся биоматериалов. Например, гетеродимерные Coiled-coil имеют различные применения в биоматериалах при конструировании гидрогелей (Yang *et al.*, 2006). Также Coiled Coil взаимодействие использовалось при мечении белков (Yano *et al.*, 2008). Это первый пример, в котором хромофор был помещен на поверхность клетки путем гетеродимеризации двух спиралей. Пептидные самособирающиеся наноструктуры использовались в качестве пептидных поверхностно-активных веществ (Mandal *et al.*, 2014), исследовательских моделей сворачивания белков и изучения конформационных нарушений белков (Doll *et al.*, 2015). Некоторые наноразмерные самособирающиеся структуры обладают центральной полостью, которая позволяет им переносить лекарственные средства или гены (Doll *et al.*, 2015, Nabibi *et al.*, 2016). Эти примеры – только малая часть способов применения спиральных пептидов. Однако, они показывают их потенциал для получения материалов, представляющих интерес для различных применений, включая доставку лекарств. Одним из многообещающих применений самособирающихся структур является применение их в разработке вакцин.

4.2. Принципы дизайна самособирающихся частиц (self-assembling polypeptide nanoparticle, SAPN)

Новый способ разработки эффективных нановакцин на основе эпитопов патогенов заключается в использовании самособирающихся в частицы пептидов (self-assembling polypeptides, SAP). Они обычно представляют собой пептиды со спиральными вторичными структурами, которые собираются вместе посредством нековалентных взаимодействий с образованием наноразмерных трубчатых, фибриллярных или сферических структур.

Одним из наиболее привлекательных структурных мотивов белка для проектирования нановакцин являются домены олигомеризации в виде спиралей. Эти мотивы состоят из двух или более α -спиралей, обернутых друг вокруг друга (Coiled Coil мотивы). Coiled Coil мотивы являются одним из наиболее распространенных, лучше всего понимаемых и стабильных доменов олигомеризации (Burkhard *et al.*, 2001).

Перспективными для разработки вакцин являются самособирающиеся белковые наночастицы (SAPN). SAPN – это спроектированные повторяющиеся антигенные дисплеи, которые могут быть предназначены для широкого спектра антигенов. SAPN обычно состоят из повторяющихся мотивов, что позволяет встраивать антигены в их структуры таким образом, что они экспонируются на поверхности собранных частиц, тем самым создавая химерные

наночастицы для использования их в качестве носителей антигенов. Эпитопы могут быть включены либо на С-конец, либо на N-конец каждого мономера SAP. Такие мономеры будут собираться в частицы с правильной симметрией (Raman *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2012). Высокая плотность антигенов и структурно упорядоченное расположение антигенов на SAPN напоминают паттерны распознавания патогенов (López-Sagaseta *et al.*, 2016). Это многовалентное взаимодействие является ключевым этапом в индукции сильного иммунного ответа и является решением проблемы слабой иммуногенности отдельных эпитопов. Вместе эти факторы делают их отличными иммуностимулирующими частицами и самыми интересными кандидатами для разработки вакцинных препаратов.

Одним из основных преимуществ самособирающихся наночастиц является большое разнообразие Coiled Coil доменов. В природе существуют Coiled Coil домены, состоящие из 2, 3, 4, 5 и 6 α -спиралей, а в лабораторных условиях были синтезированы и Coiled Coil домены с 7 α -спиралями (Apostolovic *et al.*, 2010). Можно выбирать различные домены олигомеризации для более эффективной разработки вакцины-кандидата против того или иного патогена. Выбор различных доменов олигомеризации в конечном итоге изменит геометрию каждой частицы SAPN, однако они по-прежнему будут самособираться и функционировать как эффективный повторяющийся антигенный дисплей. Включение антигенов в самособирающиеся пептиды и последующее получение химерных наночастиц осуществляется посредством прямого процесса самосборки или ковалентного химического связывания антигенов с наночастицами (López-Sagaseta *et al.*, 2016).

При дизайне SAPN следует учитывать три ключевых аспекта: конформация субъединиц, взаимодействие субъединиц и регулирование их сборки. Основные методы, используемые для сборки самособирающихся наночастиц, описаны в таблице 4.

При Coiled Coil взаимодействии важны условия самосборки пептидов в наночастицы и их стабильность. Для этого важно использовать стабильные олигомеры с определенной структурой. Также на нековалентное взаимодействие между олигомерами влияют условия, при которых происходит сборка частиц (Yang *et al.*, 2012). Еще одним методом для сборки SAPN является добавление дисульфидных связей для стабилизации и надлежащей сборки. Однако, помимо внутримолекулярных дисульфидных связей, могут образовываться межмолекулярные, которые будут приводить к агрегации белков, чего следует избегать (Raman *et al.*, 2006, Usui *et al.*, 2009). Другим методом является металл-опосредованная сборка белков. Сложной задачей в этом методе является большое количество опосредованных металлом агрегатных состояний с близкими энергетическими уровнями (Brodin *et al.*, 2012). Другим инструментом, который можно использовать для создания наночастиц, является симметрия. При конструировании самособирающихся пептидов можно использовать разные домены с разными

олигомеризационными свойствами, связанных линкерами, симметрично расположенные относительно друг друга (Padilla *et al.*, 2001).

Таблица 4. Методы, используемые для сборки SAPN.

Метод	Пример	Преимущества	Ссылки на литературу
Coiled-coil взаимодействие	Пептид, содержащий пентамерные и тримерные спиральные домены (икосаэдры с $T = 1$ или $T = 3$)	Стабильные олигомеры	(Yang <i>et al.</i> , 2012)
Добавление дисульфидных связей	Филаменты, состоящие из симметричных гомоолигомеров и их связующих элементов	<ul style="list-style-type: none"> • Стабилизация SAPN • Дисульфидная связь способствует формированию надлежащей сборки 	(Raman <i>et al.</i> , 2006, Usui <i>et al.</i> , 2009)
Металл-опосредованные взаимодействия	1-D нанотрубки, 2-D и 3-D кристаллические решетки из мономерных белков	<ul style="list-style-type: none"> • Запуск сборки олигомеров с добавлением металла • Зависимость от концентрации металла 	(Brodin <i>et al.</i> , 2012)
Генетическое слияние нескольких белковых доменов или фрагментов	SAPN, состоящие из двух олигомеров, которые связаны спиральным линкером	Производство широкого спектра симметричных структур	(Padilla <i>et al.</i> , 2001)
Сборка на поверхности небиологического материала	Сборка вирусоподобных структур на поверхностях углеродных нанотрубок	Создание богато текстурированной молекулярной поверхности	(Grigoryan <i>et al.</i> , 2011)

SAPN со структурами Coiled Coil были изучены несколькими группами в качестве носителей вакцин и/или адъювантов (El Bissati *et al.*, 2014, Karch and Burkhard, 2016). Были разработаны успешные вакцины-кандидаты против таких вирусных заболеваний, как птичий грипп, атипичная пневмония и ВИЧ (Babaroor *et al.*, 2011, Pimentel *et al.*, 2009, Wahome *et al.*, 2012). При каждом вирусном заболевании, к которому применялась технология SAPN, наблюдались высокие титры антител. Одним из наиболее сложных классов инфекционных агентов для разработки вакцин являются паразитарные заболевания. Паразиты — это сложные организмы с несколькими жизненными стадиями, механизмами избегания иммунного ответа и, как правило, они способны инфицировать разных хозяев. SAPN показали себя эффективными и при разработке вакцин-кандидатов от паразитов, индуцировав сильные гуморальные и клеточные иммунные реакции против малярии на мышинных моделях, что приводит к защите от

заражения (Kaba *et al.*, 2009, Kaba *et al.*, 2012, McCoy *et al.*, 2013). Также было показано, что SAPN обладают иммуногенностью и способны индуцировать защиту от заражения *Toxoplasma gondii* (El Bissati *et al.*, 2014) на мышинной модели. Этот успех еще раз демонстрирует перспективность SAPN как новой технологии для разработки вакцин.

В работе Raman *et al.*, 2006 использовали структурный мотив в виде альфа-спиралей для создания самособирающихся пептидных наночастиц (Raman *et al.*, 2006). Такой дизайн имитирует белки вирусов и их икосаэдрическую симметрию. Вирусные оболочки небольших вирусов обычно состоят из одного-четырех капсидных белков, которые самостоятельно собираются в капсиды. Дизайн SAP основан на одиночной полипептидной цепи, которая самособирается в белковую наночастицу с икосаэдрической симметрией (Рис. 8). Икосаэдр имеет двойную, тройную и пятикратную оси симметрии, и две из них были включены в конструкцию путем создания химерного белка. Пентамерный домен Coiled Coil был генетически слит с тримерным доменом Coiled Coil. Линкер между ними состоит из двух остатков глицина, что обеспечивало гибкость между двумя доменами. Выравнивание этих двух доменов олигомеризации вдоль соответствующих осей симметрии икосаэдра и применение элементов симметрии создает наночастицу с икосаэдрической симметрией. Идентичные копии полипептидной цепи самособираются в наночастицы. Для образования наночастицы требуется по меньшей мере 60 белковых мономеров. Более однородные наночастицы были получены при полной денатурации пептида и его повторного сворачивания при низкой концентрации. Биофизическая характеристика показала, что были сформированы наночастицы диаметром 16 нм.

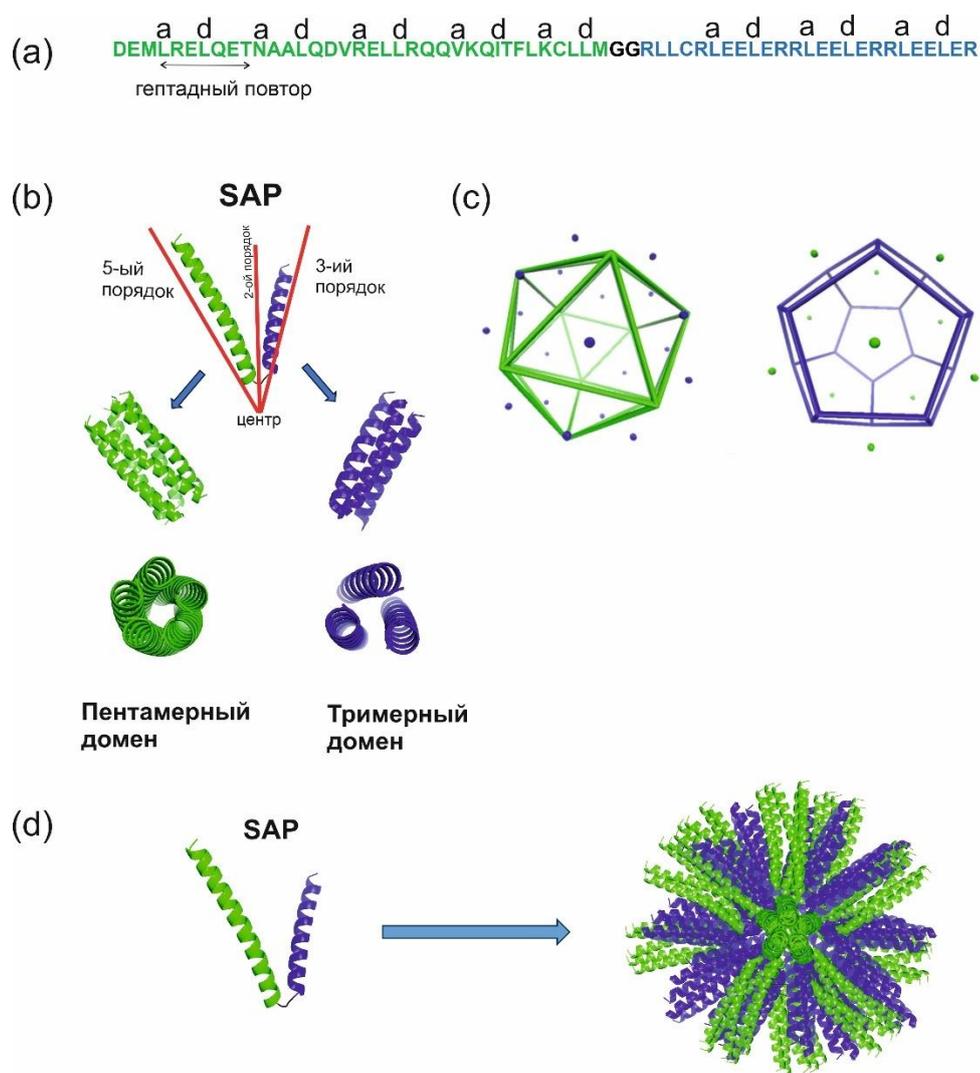


Рисунок 8. Coiled Coil спирали как строительные блоки для самосборки SAPN. (a) Последовательность самособирающегося пептида SAP (Raman *et al.*, 2006); (b) Структурная модель мономера SAP. Зеленым цветом отмечен пентамерный спиральный домен, синим цветом отмечен тримерный спиральный домен. Оси симметрии вращения (двукратные, трехкратные и пятикратные) показаны красными линиями; (c) Мономеры SAP располагаются вдоль осей симметрии пятого и третьего порядка икосаэдра или додекаэдра (Indelicato *et al.*, 2016); (d) 3D-модель наночастицы, собранной из мономеров SAP. Все мономеры получены с помощью программы AlphaFold v2.3.1, визуализация с помощью программы PyMOL.

4.3. Преимущества и недостатки использования самособирающихся частиц при создании вакцин

В основном, пептидные строительные блоки синтезируются с помощью двух основных подходов: создания рекомбинантных белков на «генетическом» уровне и химических методов (Habibi *et al.*, 2016). Химические методы могут быть использованы для синтеза коротких пептидов, тогда как технология рекомбинантных белков является подходом для получения более сложных полипептидов. Факторами, влияющими на сборку SAPN, являются концентрация пептидов в растворе, pH буфера (Doll *et al.*, 2015). Также при крупномасштабном производстве важно учитывать степень очистки белков.

При получении SAPN возникают некоторые проблемы, которые связаны с необходимыми окончательными свойствами частиц (Таблица 5).

Таблица 5. Основные проблемы в получении SAPN.

Цель	Проблема	Решение	Источник
Контроль и ограничение сборки	Агрегация и нежелательное увеличение наночастиц, приводящие к полидисперсному образованию	Отталкивание заряда на N-концах спиральных субъединиц	(Fletcher <i>et al.</i> , 2013)
Получение рекомбинантных белков в растворимой форме во время экспрессии белка в бактериях	Образование крупных агрегатов в тельцах включения	<ul style="list-style-type: none"> • Отдельное получение компонентов или субъединиц в различных бактериальных штаммах и смешивание очищенных растворимых компонентов впоследствии • Добавление металлов или лигандов, которые запускают смешанную сборку дискретных субъединиц 	(Usui <i>et al.</i> , 2009, Brodin <i>et al.</i> , 2012)
Достижение олигомеризации	Биофизические проблемы, такие как существование конкурирующих состояний олигомеризации с небольшими различиями в энергетических уровнях	Моделирование <i>de novo</i> структуры с расчетами устойчивости	(Marsh <i>et al.</i> , 2013)

Наноразмерный масштаб SAPN делают их похожими на патогены. Более того, их морфологическая форма и повторяющаяся структура позволяют увеличивать число антигенов на их поверхности, что приводит к их распознаванию с помощью рецепторов и активации иммунной системы (Rudra *et al.*, 2012). Положение антигена в частицах хорошо контролируемо. Кроме того, белковые SAPN биосовместимы и биоразлагаемы.

Одной из важных проблем в разработке вакцин является создание и поддержание баланса между иммуногенностью и воспалением. Главным образом эта проблема актуальна для вакцин, которые включают провоспалительные адъюванты, такие как гидроксид алюминия (Al(OH)₃) или фосфат алюминия (AlPO₄). Самоадъювантность SAPN позволяет

разрабатывать вакцины, которые не включают адъюванты, что является ключевым преимуществом, учитывая возможное воспаление и токсичность, вызванную адъювантами (Chen *et al.*, 2013).

С другой стороны, некоторые проблемы, связанные с SAPN, сохраняются, такие как их стабильность и точный контроль размеров. Последовательность белка, независимо от того, насколько она хорошо спроектирована, не всегда идеально коррелирует с реальной структурой (Broomley *et al.*, 2008). Эта проблема приводит к необходимости эмпирического тестирования и оптимизации каждой конструкции для достижения желаемой структуры и, в конечном счете, желаемого защитного эффекта у вакцинированных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы

Штамм *E. coli* DLT1270 - производное штамма DH10B (Grant *et al.*, 1990), в хромосому которого был интегрирован ген репрессора лактозного оперона *lacI*. Штамм агробактерий *A. tumefaciens* GV3101. Все штаммы взяты из коллекции лаборатории систем молекулярного клонирования ФИЦ Биотехнологии РАН.

Векторы для клонирования и экспрессии

Для клонирования использовали векторы pTZ57R, pGEM-t, pQE30. Для экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli* был использован вектор pQE30 (Qiagen). Для экспрессии рекомбинантных белков в растениях *N. Benthamiana* был использован вектор pEff на основе вируса X картофеля (Mardanova *et al.*, 2017).

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности

Нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты рекомбинантных белков, были синтезированы фирмами Евроген и Синтол. Эти фрагменты были использованы для конструирования последовательности генов рекомбинантных белков, путем «отжига» и соединения по сайтам рестрикции через лигирование и последующее клонирование. Правильность последовательностей была подтверждена секвенированием.

Консенсусная последовательность внешнего домена M2 белка вируса гриппа человека (M2eh) с заменой цистеинов на серины (De Filette *et al.*, 2005):

```
agtctgctta cggagggtga aaccccaatt cgcaacgagt ggggttctcg ttctaataatgat agcagtgac
s l l t e v e t p i r n e w g s r s n d s s d
>>.....M2eh(C-S).....>>
```

Нуклеотидная и аминокислотная последовательность участка второй субъединицы гемагглютинаина HA2 второй филогенетической группы (76-130 а.о.) (Stepanova *et al.*, 2018):

```
AlwNI
BstYI
HaeII
cgtattcagg atctggaaaa atatgtgaa gataccaaaa ttgatctgtg gtcctataat gcggaactgc tgggtggcgt
r i q d l e k y v e d t k i d l w s y n a e l l v a
>>.....HA2.....>>

TaqII
MspA1I
PvuII
PciI
ggaaaatcag cataccattg atctgaccga ttccgaaatg aataaactgt ttgaaaaaac ccgtcgtcag ctgctgtaaa
l e n q h t i d l t d s e m n k l f e k t r r q l r e
>>.....HA2.....>>

atgcg
n a
>...> HA2
```

Нуклеотидная и аминокислотная последовательность спирального линкера (Sp) (Arai *et al.*, 2001):

R2 SAP: TCA GAA AGG TAA TCT GTT TCA CCT GCT GAC GCA GCA GTT CAC GCA
CAT CC

F3 SAP: GAT GGG CGG CCG TCT GCT GTG CCG TCT GGA AGA ACT GGA ACG TCG
TCT GG

R3 SAP: TTC CAG TTC TTC CAG ACG GCA CAG CAG ACG GCC GCC CAT CAG CAG
GCA TT

F4 SAP: AAG AAC TGG AAC GTC GTC TGG AAG AAC TGG AAC GTC GTG AT

R4 SAP: ATC ACG ACG TTC CAG TTC TTC CAG ACG ACG TTC CAG TTC TTC CAG
ACG ACG

GS-Ha2_GSbgl2_F: ATAGATCTAGGTGGCGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGTTCTCGT ATTCAGGATCTG GAAA AATATGTG

GS-Ha2_bgl2_R: AT AGATCT CC CGCATTTTCACGCAGCTG

Pr-F P_{all}_his: atatGGCGCGCCATGAGAGGATCGCATCAC

Pr-R B_{lpI}_S_{maI}: atatCCCGGGTCCAAGCTCAGCTAATTAAG

F pQE: GGC GTA TCA CGA GGC CCT TTC G

R pQE: CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G

Используемые среды и ферменты

Бактерии культивировали в LB бульоне, либо на чашках Петри с LB агаром при 37°C с добавлением в случае необходимости селективного антибиотика ампициллина (100 мкг/мл), канамицина (50 мкг/мл), гентамицина (25 мкг/мл), рифампицина (50 мкг/мл).

Ферменты T4 DNA лигаза (SibEnzyme), фосфатаза (Thermo Scientific), фрагмент Кленова (Thermo Scientific) и эндонуклеазы рестрикции (SibEnzyme, Thermo Scientific) были использованы в соответствии с инструкциями производителя. Для ПЦР использовали ДНК-полимеразу GoTaq® Flexi (Promega), дезоксинуклеотиды (dNTP) (Thermo Scientific). Индукцию экспрессии рекомбинантных белков проводили добавлением изопропила-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Suzhou Yaco Science). Для очистки белков использовали метод металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Qiagen).

Конструирование векторов

При конструировании векторов использовали методы генной инженерии, такие как рестрикция, лигирование, дефосфорилирование векторной ДНК в соответствии с общепринятыми методиками (Sambrook *et al.*, 1989). Фрагменты ДНК разделяли путем электрофореза в агарозном геле (Suzhou Yaco Science Co) в однократном трис-ацетатном буфере (TAE) с добавлением бромистого этидия (0,5 мг/л). Использовали маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

Получение компетентных клеток *E.coli* и трансформация

Клетки *E. coli* засеивали в 25 мл LB и выращивали при 37°C до OD₆₀₀=0,3-0,4. Собирали клетки центрифугированием при 13000 rpm (Centrifuge Mikro 20, Hettich) в течение 1 минуты. Затем клетки суспендировали на ледяной бане в 2 мл буфера SBI следующего состава: (CaCl₂ – 50 mM, MnCl₂ – 10 mM, KCl – 100 mM, HEPES – 10 mM, pH 6.3). Инкубировали 10 минут. Потом клетки собирали центрифугированием 20 секунд, супернатант отбрасывали и суспендировали клетки в 2 мл SBI с инкубацией 5 минут на льду. Потом снова собирали клетки центрифугированием 20 секунд и суспендировали в 1 мл SBI с добавлением 0,2 мл 80% глицерина. Помещали на хранение при -80°C.

Полученными экспрессионными векторами трансформировали бактериальные клетки *E. coli* методом heat shock (Sambrook *et al.*, 1989). Скрининг колоний проводили с помощью ПЦР или рестрикционным анализом.

Получение компетентных клеток агробактерий GV3101

Штамм *A. tumefaciens* GV3101 выращивали на чашке Петри (антибиотики рифампицин, гентамицин). Растили трое суток в термостате при температуре 28-30°C. Потом сеяли единичную колонию агробактерий в LB-бульоне с соответствующими антибиотиками. Выращивали ночь при 30°C. Утром делали разведение 1:50 и выращивали 50 мл с антибиотиками при 30°C до OD₆₀₀=0,7. Затем собирали клетки центрифугированием при 4°C 12 минут на скорости 4000g (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Осадок ресуспендировали в стерильной MQ воде по соотношению: на 50 мл культуры - 20 мл воды. Затем собирали клетки центрифугированием при 4°C в течение 12 минут на скорости 4000g и повторяли так три раза. Потом вновь ресуспендировали осадок, но в стерильном 10% глицерине: на 50 мл культуры - 10 мл глицерина. Собирали клетки центрифугированием при 4°C в течение 12 минут на скорости 4000g. Удаляли глицерин, осадок ресуспендировали в 250 мкл 10% стерильного глицерина. Помещали на хранение при -80°C.

Трансформация агробактерий

После конструирования в *E. coli* рекомбинантный вектор pEff был перенесен в штамм *A. tumefaciens* GV3101 с помощью электропорации. К 100 мкл компетентных клеток GV3101 добавляли 10 мкл плазмидной ДНК. Проводили электропорацию при 2500 V. Затем добавляли LB и растили клетки при 30°C в течение 3-4 часов. Потом сеяли на чашку с антибиотиками: канамицин (50 мкг/мл), рифампицин (50 мкг/мл), гентамицин (25 мкг/мл).

Продукция рекомбинантных белков в клетках *E. coli*

Экспрессионные векторы на основе pQE30 были трансформированы в штамм *E. coli* DLT1270. Клетки из отдельной колонии инокулировали с агара в 5 мл LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Инкубировали ночь при 37°C на качалке (130 об/мин). Далее полученные ночные культуры в разведении 1:100 засеивали в 200-250 мл LB бульона (100 мкг/мл

ампициллина) и инкубировали при 37°C на качалке пока плотность клеток не достигнет середины логарифмической фазы роста ($OD_{600} \sim 0,5$). Отбирали пробу культуры до индукции. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивировать в течение 4 часов при 37°C или при комнатной температуре (20-25°C) в течение 14-18 часов. Анализ экспрессии белков проводили с помощью электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецил сульфата натрия (SDS-PAGE). SDS-PAGE проводили по стандартным методикам в 10-12% полиакриламидном геле (Laemmli, 1970), используя маркеры молекулярной массы (Bio-rad, ServiceBio).

Выделение рекомбинатных белков из клеток *E.coli*

После индукции клетки собирали центрифугированием при 4000g (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) в течение 30 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мМ PBS pH 7.2 с добавлением 1 мг/мл лизоцима, инкубировали 30 мин при комнатной температуре, с последующей заморозкой при -20° С. После размораживания клетки разрушали ультразвуком на льду с использованием Bandelin SONOPULS HD 2200 (Bandelin electronic GmbH). После центрифугирования при 4000g 30 минут осадок ресуспендировали и инкубировали в течение ночи при 4°C в денатурирующем буфере 10мМ PBS, 6М гуанидин хлорид, 0,5М NaCl. После центрифугирования при 13000g в течение 10 мин полученный супернатант использовали для очистки рекомбинантных белков с помощью металлоаффинной хроматографии.

Рекомбинантные белки, содержащие His-tag, сорбировали на Ni-NTA агарозе (Qiagen) в 10 мМ Na-фосфатном буфере с 0,5 М NaCl и 6 М гуанидин хлоридом. Первую промывку проводили в 10 мМ фосфатном буфере с 0,5 М NaCl, 6 М гуанидин хлоридом, 16 мМ имидазола. Второй этап отмывки проводили в денатурирующем буфере с мочевиной (10 мМ фосфатный буфер, 6 М мочевины, 0,5 М NaCl, 16 мМ имидазола). Элюцию белков проводили тем же буфером, содержащим 500 мМ имидазола. Затем очищенные белки подвергали диализу с использованием 10 мМ PBS со ступенчатым снижением концентрации мочевины: 6 М, 4 М, 2 М, 1 М. Заключительный диализ проводили при 10 мМ PBS (pH 7.2).

Агроинфльтрация растений *Nicotiana benthamiana*

Растения выращивали в теплице при 16-часовом дневном режиме с дополнительным освещением фитолампами полного спектра действия. Рекомбинантные штаммы *A. tumefaciens* GV3101 с целевыми векторами выращивали на чашках с антибиотиками. Растили трое суток в термостате при температуре 28-30°C. Потом сеяли единичную колонию агробактерий в LB-бульоне с теми же антибиотиками. Растили сутки на качалке при 28-30°C. Клетки осаждали на центрифуге (Mikro20 Hettich zentrifugen) при 4000 rpm в течение 5 минут, осадок ресуспендировали в буфере Mg/MES (pH 5.6) (MgSO₄ 10 мМ, MES (2-(N-Морфолино)-этансульфоновая кислота 10 мМ). Потом снова центрифугировали при 4000 rpm в течение 5

минут, осадок ресуспендировали в буфере Mg/MES (pH 5.6). После определения оптической плотности OD600 разбавляли концентрацию клеток до 0,2 и вводили агробактерии в листья растений *N. benthamiana* с помощью шприца без иглы. Листья собирали через 2-3 дня после инфильтрации.

Выделение белков из растений

Для определения наличия экспрессии кусочки инфильтрированных листьев (8-10 мг) вырезали и гомогенизировали в 50 мкл буфера PBS. К полученному препарату добавляли половину объема трехкратного буфера, содержащего 40% глицерина, 4% SDS, 50 мМ Tris pH 6.8, 1% бромфенолового синего, 5% бета-меркаптоэтанола. Анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга 10 мкл полученной смеси, которая соответствует примерно 1 мг ткани листа.

Растительные белки были очищены в денатурирующих условиях. Через два-три дня после инфильтрации листья *N. benthamiana* гомогенизировали в растворе, содержащем 10 мМ буфер PBS (pH 7.2), 6 М гуанидин-HCl, 0,5 М NaCl. Для полной денатурации белка в буфере проводили инкубацию в течение 12 часов при температуре +10°C. Затем полученную смесь центрифугировали при 13000g в течение 15 минут. Затем, для сорбции целевых белков, осветленный раствор инкубировали с предварительно уравновешенной сорбционным буфером Ni-NTA (Qiagen) агарозой в течение 1 часа при комнатной температуре. Отмывку проводили в три этапа. Отмывка I: 10мМ буфер PBS, 6М гуанидина хлорида, 0,5М NaCl, 5мМ имидазола. Отмывка II: 10мМ буфер PBS, 6М мочевины, 0,5М NaCl, 10 мМ имидазола. Элюцию проводили в буфере 10мМ буфер PBS, 6М Мочевины, 0,5М NaCl, 500 мМ имидазола.

После элюирования белок подвергали диализу с использованием 10 мМ PBS буфера, содержащего 6 М мочевины и 500 мМ NaCl. Затем рекомбинантный белок снова очищали на смоле Ni-NTA, как описано выше, но концентрация имидазола при первой и второй промывках была увеличена до 16 и 20 мМ соответственно. После элюирования белок подвергали поэтапному диализу с использованием буферов PBS (10 мМ PBS, 150 мМ NaCl), содержащих 4М, 2М, 1М, 0,5М мочевины и в конце без мочевины.

Определение концентрации белков

Концентрацию белков определяли методом Брэдфорд с набором Bio-Rad Protein assay kit согласно инструкции (Bradford, 1976). Калибровочную кривую строили, используя концентрацию от 0,25 до 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Вестерн-блот анализ образцов белка

После разделения в SDS-PAGE белки переносили на мембрану Hybond-P (GE Healthcare, США) полусухим переносом с использованием системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, США). Далее мембрану инкубировали в 5% растворе сухого обезжиренного

молока в 10 мМ PBS в течение ночи. Затем мембрану инкубировали с мышинными поликлональными антителами против M2e или против SAP в буфере PBS в течение 1 часа. Затем мембрану трижды промывали буфером PBS с 0,05% Tween и инкубировали в течение 1 часа с моноклональными козьими анти-мышинными антителами, конъюгированные с пероксидазой хрена IgG HRP (W4021, Promega, США). После инкубации мембрану трижды промывали буфером PBS с 0,05% Tween. Специфические белковые комплексы визуализировали с помощью набора Western Blot ECL Plus kit (GE Healthcare) и хемилюминесцентного детектора Fusion Solo X (Vilber, Eberhardzell, Germany).

Структурный анализ рекомбинантных белков

Наличие наночастиц в препаратах полученных рекомбинантных белков, выявляли с помощью атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии, а также с помощью метода динамического рассеяния света.

Атомно-силовую микроскопию проводили на приборе Integra Prima (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме с помощью кремниевых кантилеверов с проводящим покрытием Au и наконечником с радиусом кривизны ~ 35 Нм (NSG01, NT-MDT, Россия). Образец белка наносили на сапфировую подложку, покрытую слюдой, и сушили при комнатной температуре.

Просвечивающую электронную микроскопию проводили на приборе JEM 1400 (JEOL, Япония). Использовался метод негативного контрастирования 1%-ным раствором уранилацетата.

Анализ размера частиц методом динамического рассеяния света проводили с использованием анализатора размера частиц Zetasizer Nano S90 (Malvern) с квадратными полистирольными кюветами диаметром 12 мм (DTS0012) при 25°C.

Иммуноферментный анализ

Планшет покрывали в течение ночи при температуре 4°C двукратными разведениями в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 8,5). После однократной промывки PBST (PBS с 0,05% Tween) лунки обрабатывали блокирующим буфером (1% BSA в PBS) в течение 1 часа при температуре 37°C. После однократной промывки PBS планшеты обрабатывали поликлональными M2e- или SAP-специфичными сыворотками в течение 30 мин при 37°C. Затем планшеты промывали PBST 5 раз. После пяти промывок добавляли моноклональные козы анти-мышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена IgG HRP (W4021, Promega, США), в разведении 1:10000 и инкубировали в течение 30 минут. После этого лунки промывали пять раз PBST. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин ("Вектор-БЕСТ", Новосибирск, Россия). Реакцию останавливали добавлением HCl (0,5 N) и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра.

Иммунизация лабораторных животных

Опыты по иммуногенности и протективности полученных рекомбинантных белков были проведены в ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

Для проверки иммуногенности белков 19s-SAP-Sp-4M2eh, 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19s-Sp-4M2eh, 19s-Sp-2HA2-4M2eh были использованы самки мышей BALB/c (16-18 г), в каждой группе по 35-40 штук. Животные были иммунизированы трехкратно интраназально с двухнедельными интервалами в дозе 50 мкг/мышь без адъювантов. Контрольной группе вводили PBS.

Образцы сывороток и бронхоальвеолярных лаважей пяти мышей были собраны на 14-й день после третьей иммунизации для определения титров антител. Через четырнадцать дней после третьей иммунизации животных подвергли эвтаназии в камере с CO₂ и выделили образцы суспензии клеток легких и селезенки.

Для проверки иммуногенности белков 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh, а также полученного в растениях белка 19S-SAP-Sp-4M2eh были использованы самки мышей BALB/c (16-18 г) в каждой группе по 10-14 штук. Животные были иммунизированы трехкратно подкожно с двухнедельными интервалами в дозе 50 мкг/мышь рекомбинантного белка с адъювантом дезоксирибонуклеата натрия (Деринат, 1 мг). Контрольной группе подкожно вводили PBS. Образцы сывороток и бронхоальвеолярных лаважей четырех мышей были собраны после третьей иммунизации на 14-й день для определения титров антител. Для изучения Т-клеточного иммунного ответа самок мышей C57BL/6 (гаплотип H-2b) (16-18 г, по 5 мышей в каждой группе) иммунизировали таким же образом. Через четырнадцать дней после третьей иммунизации животных подвергли эвтаназии в газовой камере с CO₂ и выделили образцы суспензии клеток селезенки.

Имуноферментный анализ сывороток крови и бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ)

Титры антител в образцах БАЛ и сывороток измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Синтетический пептид M2e G37 (SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD) (5 мкг/мл) или вирус гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) (1 мкг/мл) в PBS использовали для покрытия 96-луночных планшетов для микротитрования (Greiner). В качестве конъюгата использовали козий поликлональный антимишиный IgG (Abcam), меченный пероксидазой хрена. После добавления тетраметилбензидинового субстрата (BD Biosciences) и проявления окраски реакцию останавливали с помощью H₂SO₄ и измеряли OD₄₅₀ на микропланшетном спектрофотометре.

Выделение клеток из легких и селезенки для анализа Т-клеточного иммунного ответа

Через две недели после третьей иммунизации по 5 мышей из каждой группы подвергли эвтаназии в CO₂-камере. Спленциты и клетки легких мышей получали в соответствии с протоколом BD Pharmingen™, как описано в (Stepanova *et al.*, 2018). Селезенки мышей удаляли

асептически, измельчали с помощью Medimachine (BD Biosciences) и очищали от клеточного дебриса фильтрованием через фильтр 70 мкм (Spring Filcons, BD Biosciences). Затем клеточную суспензию промывали раствором RPMI-1640, содержащем 7,5% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамина и 0,05 mM меркаптоэтанол. Эритроциты лизировали с помощью буфера для лизиса АСК (10 mM KHCO_3 , 0,15 M NH_4Cl , 0,1 mM Na_2EDTA , pH 7,2–7,4). Затем к раствору добавляли 10 мл среды RPMI-1640 и собирали клетки центрифугированием при $500\times g$ в течение 5 мин. Клетки снова промывали 10 мл среды RPMI-1640 и ресуспендировали в среде RPMI-1640 с добавлением антибиотиков (100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Наконец, титры клеток доводили до 5×10^6 клеток/мл. 200 мкл (1×10^6) клеточной суспензии переносили в 96-луночные планшеты с плоским дном и инкубировали в течение 18 часов при 37°C с 5% CO_2 .

Легкие мышей удаляли в асептических условиях и помещали в среду RPMI-1640 с 0,5 мг/мл коллагеназы (C2674, Sigma) и 25 мкг/мл ДНКазы (D4263, Sigma). Легкие гомогенизировали с помощью TissueLyser II (Qiagen) в термошейкере (45 мин, 37°C). Клетки легких подвергали дальнейшей обработке, как описано выше.

Определение антиген-специфических эффекторных Т-клеток памяти

Определение антиген-специфических эффекторных Т-клеток памяти осуществляли как описано в Stepanova *et al.*, 2017. Многопараметрическую проточную цитометрию проводили в соответствии с протоколом BD Pharmingen™ (BD Biosciences). Определяли способность исследуемых рекомбинантных белков индуцировать в легких и селезенках образование специфических CD4^+ и CD8^+ Т-лимфоцитов памяти, продуцирующих цитокины.

Клетки активировали в планшетах с плоским дном с пептидами (10 мкг) (6 ч при 37°C , 5% CO_2) или с вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (1 мкг) (24 ч при 37°C , 5% CO_2) в присутствии 1 мкг/мл брефелдина А (BD Bioscience) (6 ч) и очищенных антител против мышинового CD28 (24 ч). После стимуляции клетки переносили на планшеты с коническим дном, чтобы свести к минимуму потерю клеток. Рецепторы Fc блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen) в течение 30 мин. Затем клетки инкубировали с Zombie Aqua (набор для определения живых клеток Zombie Aqua Fixable Viability Kit, Biolegend), далее с антителами CD3a-FITC, CD4 PerCP, CD8-APC-Cy7, CD62L-PE-Cy7 и CD44-APC (BD Pharmingen) при температуре $2-8^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Клетки подвергали пермеабиллизации в соответствии с протоколом тест-системы Cytotfix/Cytoperm Plus (BD Bioscience) и окрашивали антителами TNF- β -BV421, IFN- γ -PE и IL-2-BV711 (BD Biosciences) (Stepanova *et al.*, 2017). Сбор данных проводили на проточном цитометре Cytotflex (Beckman Coulter).

Оценка протективности рекомбинантных белков

Для оценки протективности рекомбинантных белков использовали модель летальной гриппозной инфекции. Через 2 недели после последней иммунизации мышей интраназально заражали адаптированными к мышам вирусами гриппа A/PR/8/34 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2), полученными из коллекции вирусов гриппа в ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России. После заражения выживаемость и массу мышей регистрировали ежедневно в течение 14 дней.

Вирусовыделение из легких мышей на культуре клеток MDCK

На шестой день после заражения у 5 мышей каждой группы извлекали легкие и гомогенизировали в десятикратном объеме стерильного физиологического фосфатного буфера. Далее из гомогенатов была подготовлена серия десятикратных разведений на среде α MEM. Для оценки титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных планшетах на среде α MEM. Клетки инфицировали серийными десятикратными разведениями легочного гомогената от 10^{-1} до 10^{-7} и инкубировали в термостате ($36,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) в течение 72 часов. После инкубации переносили по 50 мкл культуральной жидкости в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Уровень репродукции вируса оценивали по реакции гемагглютинации куриных эритроцитов.

Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча, принимая за титр вируса величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали его в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса ($\lg \text{ТЦД}_{50}$).

Методы статистического анализа

Статистическая значимость различий титров антител оценивалась путем дисперсионного анализа ANOVA с применением ПО GraphPad Prism v.5. Для сравнения показателей выживаемости в различных группах мышей проводилось построение кривых Каплана-Мейера, используя ПО GraphPad Prism v5. Анализ данных проточной цитометрии осуществлялся в ПО Kaluza 2.2 (Beckman Coulter). Различия в антигенспецифических Т-клетках оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и метода Холма–Сидака (Шидака) для множественных сравнений. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

Титры антител графически представлены в виде индивидуальных значений \log_2 титров и среднего геометрического значения. Данные специфического Т-клеточного ответа представлены в виде графиков Тьюки, на которых отображаются: медиана, нижний и верхний квартили, минимальное и максимальное значение выборки и выбросы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, с помощью бактериальной системы экспрессии

В качестве носителя антигенов вируса гриппа были использованы самособирающиеся наночастицы на основе SAP пептида (Raman *et al.*, 2006). Мы получили самособирающиеся полипептидные наночастицы, используя модифицированный пентамерный спиральный домен олигомерного матриксного белка хряща (Malashkevich *et al.*, 1996), за которым следуют 26 С-концевых аминокислот, которые соответствуют тримерному спиральному домену (Raman *et al.*, 2006) (Рис. 9 (а)). Два домена олигомеризации соединены линкером, состоящим из двух остатков глицина. Последовательность SAP содержит цистеины, которые образуют внутримолекулярные дисульфидные мостики для оптимизации межспиральных контактов. На N-конце была размещена последовательность из 6 гистидинов (his). Она обеспечивает возможность очистки с помощью металл-аффинной хроматографии после экспрессии рекомбинантного белка в *E. coli*.

Второй тип частиц был получен из мономера SAP с дополнительным спиральным линкером на С-конце (Sp) (Рис. 9 (b)). Sp образует мономерную α -спираль, стабилизированную солевыми мостиками Glu—Lys⁺.

После денатурации и последующего рефолдинга пептиды SAP самособираются в наноразмерные частицы. Структура мономерного пептидного строительного блока была предсказана с использованием AlphaFold v.2.3.1 (Jumper *et al.*, 2021). Структура наночастиц, состоящих из 60 мономеров, была выполнена в соответствии с симметрией икосаэдра. Также частицы могут вмещать либо 60 мономеров в икосаэдрической симметрии $T = 1$, либо вмещать 180 мономеров в икосаэдрической симметрии $T = 3$ и иметь соответственно больший диаметр.

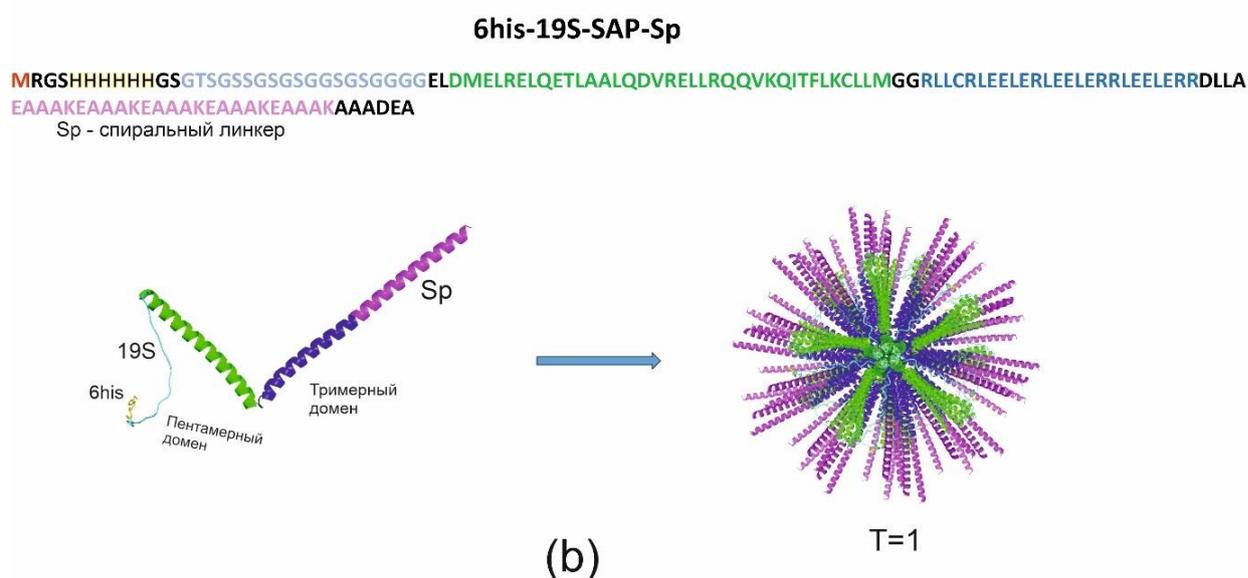
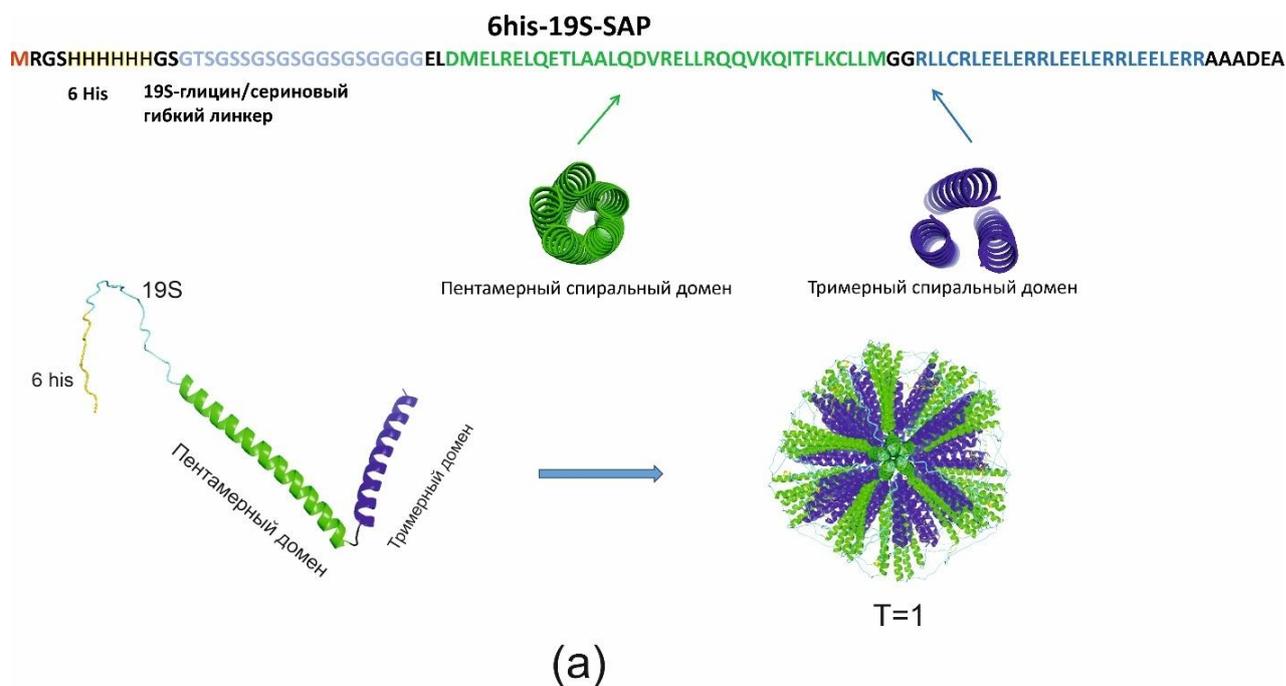


Рисунок 9. Самособирающийся в частицы пептид 19S-SAP (a) и 19S-SAP-Sp (b) со спиральным линкером Sp на C-конце. Представлена аминокислотная последовательность рекомбинантного белка, 3D-модель мономера и сборка наночастиц T=1 (60 мономеров). 3D-модель мономера получена с помощью программы AlphaFold v2.3.1, визуализация с помощью программы PyMOL. Шесть гистидинов на N-конце обозначены желтым, 19S-линкер – голубым, пентамерный домен SAP пептида – зеленым, тримерный домен SAP пептида – синим, Sp-спиральный линкер – розовым.

1.1. Получение самособирающихся наночастиц из рекомбинантных белков на основе пептида SAP

Дизайн и конструирование искусственных генов, кодирующих самособирающийся пептид (SAP) с добавлением спирального линкера (Sp)

Для получения генов целевых белков были использованы синтетические фрагменты ДНК и олигонуклеотиды, кодирующие следующие аминокислотные последовательности:

SAP-DMELRELQETLAALQDVRELLRQQVKQITFLKCLLMGGRLLCRLEELERRLEELE

RRLEELER - самособирающийся пептид с небольшой модификацией последовательности (Raman *et al.*, 2006).

Sp - EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK - спиральный линкер (Arai *et al.*, 2001).

19s - GSGTSGSSGSGSGSGSGG - гибкий глицин-богатый линкер (Robinson and Sauer, 1998).

Все гены были клонированы в плазмиду pQE30, обеспечивающую экспрессию белков с N-концевой гексагистидиновой меткой. Остатки гистидинов были отделены от целевой части белка с помощью гибкого глицин-серинового линкера 19S. Были сконструированы гены, кодирующие SAP пептид и SAP пептид со спиральным линкером Sp на C-конце.

pQE30 19S-SAP

Последовательность SAP получили в результате отжига праймеров F1 sap + R1 sap, F2 sap+R3 sap, F3 sap + R3 sap, F4 sap + R4 sap попарно и последующего лигирования продуктов (последовательности приведены в разделе Материалы и методы). Полученный фрагмент ДНК с сайтами рестрикции SacI и EcoRV клонировали в вектор pTZ57R после обработки вектора эндонуклеазами SacI и EcoRV. В результате был получен промежуточный вектор pTZ57R SAP.

На следующем этапе был осуществлен перенос вставки SAP в вектор pQE30, который перед сайтом рестрикции BamHI имеет последовательность, кодирующую шесть гистидинов. Вектор pQE30 обрабатывали рестриктазами SacI и SalI. Фрагмент SAP выделен после рестрикции по сайтам SacI, SalI из вектора pTZ57R SAP. В итоге, получили вектор pQE30, который кодирует SAP и 12 аминокислот на C-конце после сайта рестрикции EcoRV до стоп-кодона (Рис. 10(a)). Для удаления лишних нуклеотидов вектор обрабатывали эндонуклеазами EcoRV и HindIII. Затем для достройки одноцепочечных 5'-концов, которые образовались после обработки HindIII, использовали фрагмент Кленова. После циркуляризации с помощью лигирования получили вектор pQE30 SAP (Рис. 10(b)).

Для получения экспрессионного вектора pQE30 SAP-Sp была использована пара синтетических олигонуклеотидов, кодирующая последовательность спирального линкера Sp с добавлением сайтов рестрикции Ecl136II и EcoRV на 5'- и 3'- конце соответственно. После отжига полученный фрагмент Sp был встроен по сайту EcoRV в вектор pQE30 SAP. Таким образом, был получен вектор pQE30 SAP-Sp, который кодирует SAP со спиральным аланиновым линкером на его C-конце и 12 аминокислот на C-конце после сайта рестрикции EcoRV до стоп-кодона (Рис. 10(d)). Для удаления лишних нуклеотидов вектор обрабатывали эндонуклеазами EcoRV и HindIII. Затем для достройки одноцепочечных 5'-концов, которые образовались после обработки HindIII, использовали фрагмент Кленова. После циркуляризации с помощью лигирования получили вектор pQE30 SAP-Sp, который кодирует SAP со спиральным аланиновым линкером на его C-конце (Рис. 10(e)).

Для улучшения взаимодействия гексагистидиновой последовательности с Ni сорбентом, между ней и целевым белком был вставлен гибкий глицин-богатый линкер (19S). В итоге были получены векторы pQE30 19S-SAP и pQE30 19S-SAP-Sp (Рис. 10 (с, ф)).

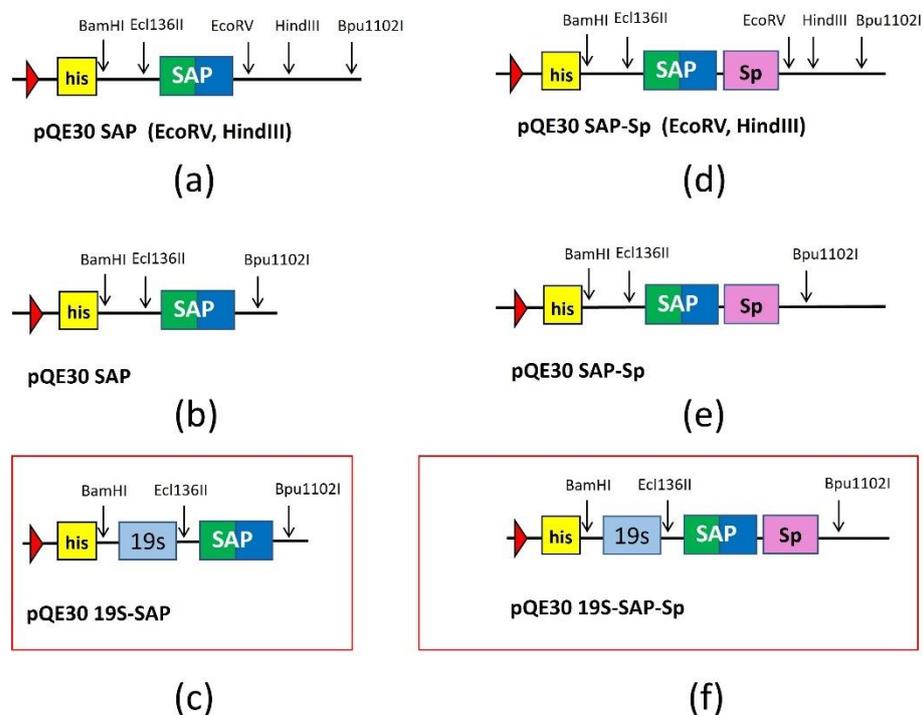


Рисунок 10. Получение экспрессионных векторов pQE30 19S-SAP, pQE30 19S-SAP-Sp.

Получение штаммов-продуцентов E. coli и очистка рекомбинантных белков

Клетки *E. coli* штамма DLT1270 трансформировали векторами pQE30 19S-SAP и pQE30 19S-SAP-Sp. Далее проводили индукцию экспрессии белка при добавлении ИПТГ до 1 мМ в течение 4 часов при температуре 37°C. Образцы белков до и после индукции были проанализированы с помощью SDS-PAGE (Рис. 11). Уровень синтеза целевого белка составлял 10-15% общего белка штамма-продуцента.

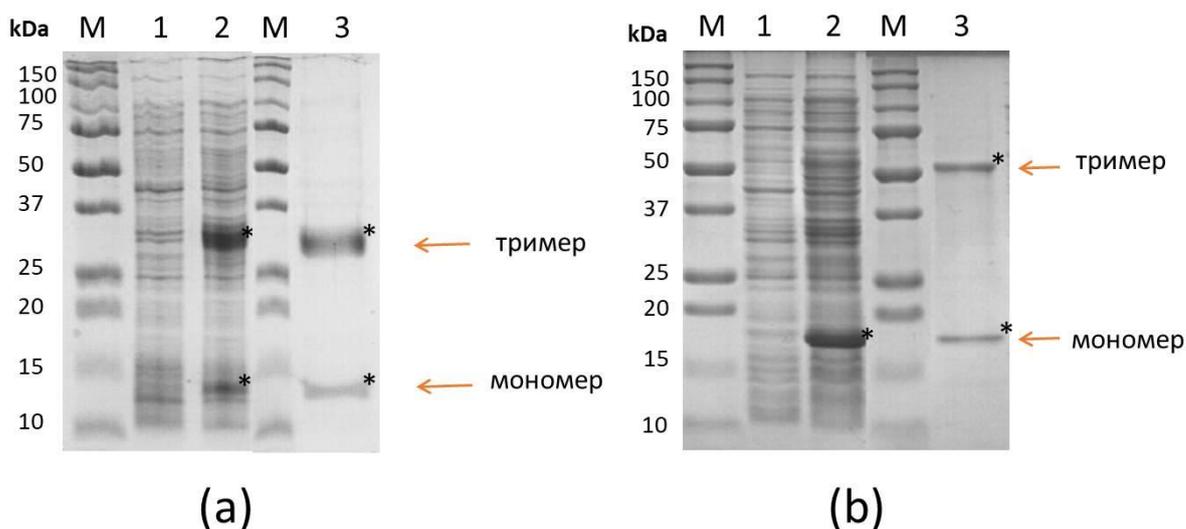
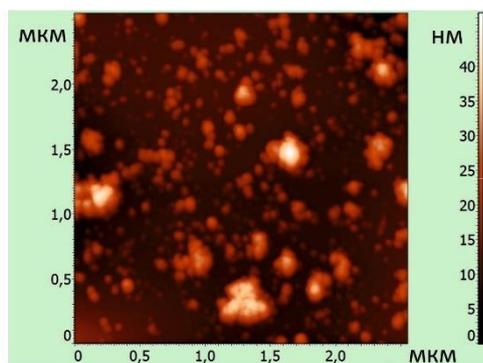


Рисунок 11. Индукция и очистка рекомбинантных белков (а) 19S-SAP, (б) 19S-SAP-Sp. М - маркер молекулярной массы (в kDa); 1 — белковый препарат из культуры *E. coli* до индукции; 2 — белковый препарат из культуры *E. coli* после индукции; 3 —очищенный на Ni-NTA-агарозе белок. Расположение целевого белка отмечено звездочкой (*). SDS-PAGE анализ белка.

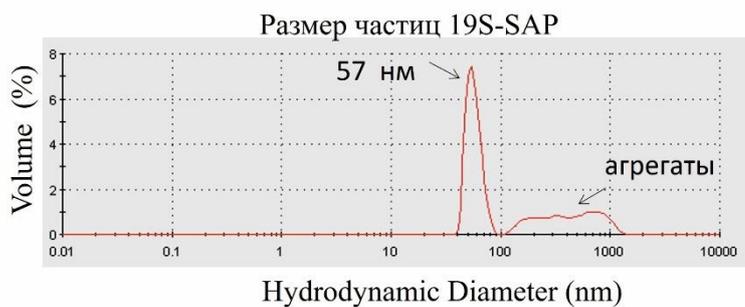
Очистку белков 19S-SAP и 19S-SAP-Sp проводили в денатурирующих условиях с помощью металлоаффинной хроматографии как описано в разделе Материалы и методы. На SDS-PAGE препарата очищенного белка помимо мономерной формы были видны также его агрегаты. Расчетная масса белка 19S-SAP составляет 10,1 кДа. На SDS-PAGE рекомбинантный белок представлен в виде двух полос, одна из которых имеет относительную молекулярную массу около 12 кДа, соответствующую мономеру, а другая – относительную молекулярную массу около 30 кДа, соответствующую тримеру (Рис. 11). Для белка 19S-SAP-Sp расчетная масса составляет 14,12 кДа. На SDS-PAGE рекомбинантный белок был также представлен в виде двух полос, одна из которых имеет относительную молекулярную массу около 18 кДа, соответствующую мономеру, а другая – относительную молекулярную массу около 55 кДа, соответствующую тримеру (Рис. 11).

Структурная характеристика полученных препаратов

Для рефолдинга очищенный белок диализовали против 10 mM PBS со ступенчатым понижением концентрации мочевины: 4M, 2M, 1M, 0,5M. Финальный этап диализа проводили в 10 mM PBS pH 7.4. Затем анализировали препараты с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии, а также методом динамического рассеяния света. Препарат 19s-SAP после рефолдинга формирует крупные агрегаты и при хранении выпадает в осадок (Рис. 12). Кроме того, был проведен рефолдинг с разбавлением концентрации белка до 0,1 мг/мл. Однако после диализа и концентрирования препарат также агрегировал и выпадал в осадок.



(a)



(b)

Рисунок 12. Анализ структуры частиц 19s-SAP после рефолдинга путем диализа со ступенчатым понижением концентрации мочевины с помощью атомно-силовой (a) и анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (b).

По сравнению с белком 19s-SAP препарат 19S-SAP-Sp с дополнительным спиральным линкером формирует более однородные по размеру частицы, менее склонные к агрегации и не выпадающие в осадок при хранении. Рекомбинантный белок 19s-SAP-Sp после рефолдинга образует частицы размером 15-25 нм по данным микроскопии. По данным анализатора размера частиц их гидродинамический диаметр составляет 29 ± 2 нм (Рис. 13).

Таким образом, были получены наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP с дополнительно введенным спиральным линкером Sp, который удлиняет С-концевую часть пептида и способствует стабилизации наночастиц.

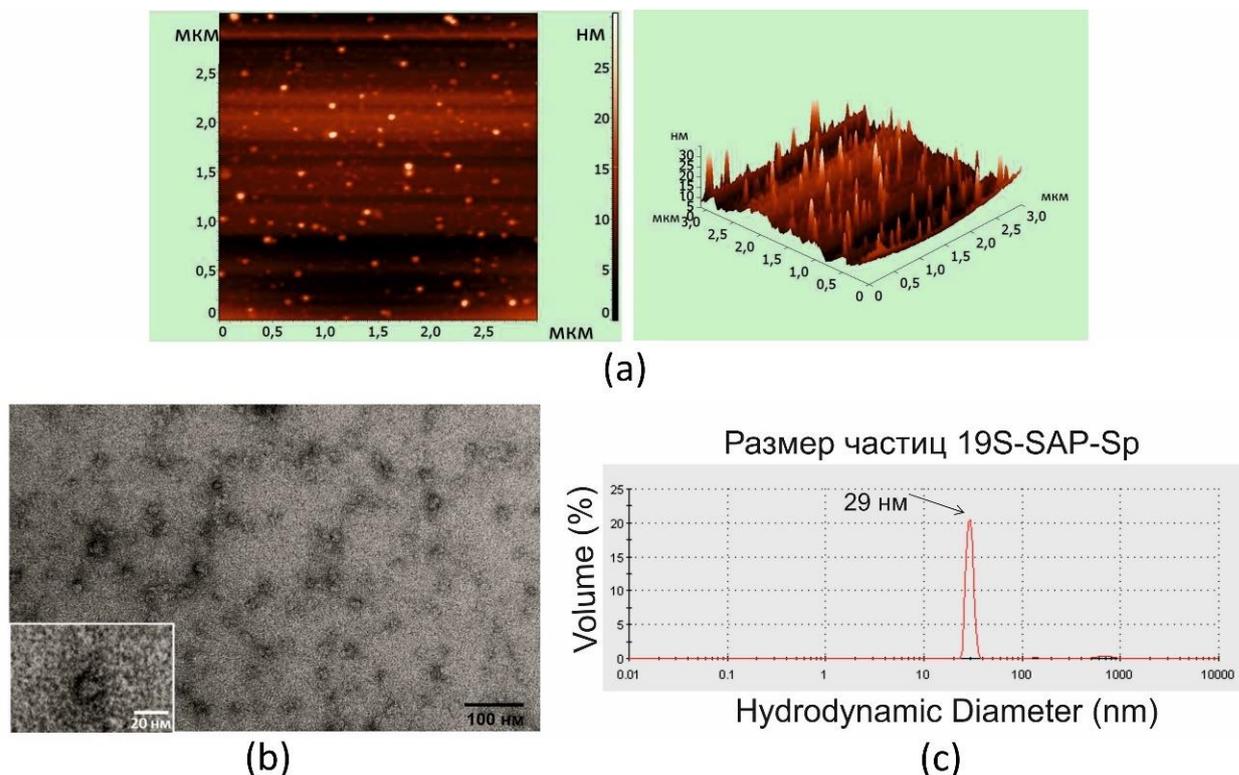


Рисунок 13. Анализ структуры частиц 19s-SAP-Sp после рефолдинга путем диализа со ступенчатым понижением концентрации мочевины с помощью атомно-силовой (a) и электронной микроскопии (b), анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (c).

1.2. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, содержащих M2e пептид и консервативную последовательность второй субъединицы гемагглютинина HA2, характеристика их иммуногенности и протективного действия

Полученные на предыдущем этапе работы наночастицы могут быть использованы в качестве носителей консервативных эпитопов вируса гриппа. Такими консервативными эпитопами могут быть внеклеточный домен M2 белка (M2e) и консервативная область (76-130 а.о.) второй (HA2) субъединицы гемагглютинина вируса гриппа.

M2e — это высококонсервативный пептид. Различные типы рекомбинантных вакцин на основе M2e могут обеспечивать защиту широкого спектра действия на животных моделях (Saelens, 2019, Schotsaert *et al.*, 2009). M2e-специфические антитела, главным образом IgG, являются основными участниками иммунной защиты. Антитела против M2e не обладают вируснейтрализующей активностью, но, как было показано, обеспечивают защиту посредством механизма антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) инфицированных клеток, дополнительно ограничивая репликацию вируса и способствуя ускоренному выведению вируса, а также уменьшая тяжесть заболевания.

Гемагглютинин также имеет консервативные последовательности в стволовой области второй субъединицы (HA2). Такие фрагменты могут индуцировать образование антител против

широкого спектра гемагглютининов различных подтипов (Corti *et al.*, 2011, Krammer and Palese, 2015, Wang *et al.*, 2010). Антитела, специфичные к стволу области HA2, не обязательно нейтрализуют вирус и вместо этого могут использовать другие механизмы, способствующие широкой защите, такие как ADCC, для вирусного клиренса после заражения (Jegaskanda *et al.*, 2013, DiLillo *et al.*, 2014, Epstein, 2018).

В качестве основы для рекомбинантных вакцинных белков были использованы консервативные антигены — пептид M2e и консервативная область (76-130 а.о.) второй (HA2) субъединицы гемагглютиниона вируса гриппа А второй филогенетической группы. Последовательности целевых пептидов:

M2eh SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD - консенсусная последовательность M2e пептида вируса гриппа человека с заменой цистеинов на серины (De Filette *et al.*, 2005);

HA2 RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFKTRRQLRENA - консервативный участок гемагглютиниона HA2-2 (76-130 а.о.), консенсусная последовательность вирусов гриппа А/Н3N2 и А/Н7N9 (Stepanova *et al.*, 2018).

Первые два рекомбинантных белка содержали только пептид M2e, в то время как вторая пара включала как M2e, так и HA2. В последовательности M2e цистеины в положениях 17 и 19 были заменены серинами для предотвращения образования дисульфидных связей и агрегации белка. Такая модификация не влияет на иммунологические свойства M2e (De Filette *et al.*, 2005). Поскольку увеличение количества пептидов M2e в рекомбинантном белке усиливает иммунный ответ против M2e, мы включили четыре тандемные копии M2e в слитые белки (Ravin *et al.*, 2015). Пептид HA2 также был включен в двух копиях с целью повышения его иммуногенности.

Чтобы получить наноразмерные частицы, мы включили самособирающийся пептид в рекомбинантные белки перед антигенами вируса гриппа. Контрольные белки содержали либо четыре копии M2e или четыре копии M2e и две копии HA2, но не содержали SAP. Чтобы облегчить взаимодействие белка с Ni-сорбентом, N-концевую гексагистидиновую последовательность отделяли от остальной части белка с помощью гибкого глицин-серинового линкера длиной 19 а.о. (19s). Гибкий линкер (GS) длиной 10 а.о. использовался для разделения пептидов HA2. Таким образом, было сконструировано четыре рекомбинантных белка: два белка, которые должны были обеспечивать образование наночастиц (19s-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh), и два контрольных белка без SAP (19s-Sp-4M2eh и 19s-Sp-2HA2-4M2eh) (Рис. 14).

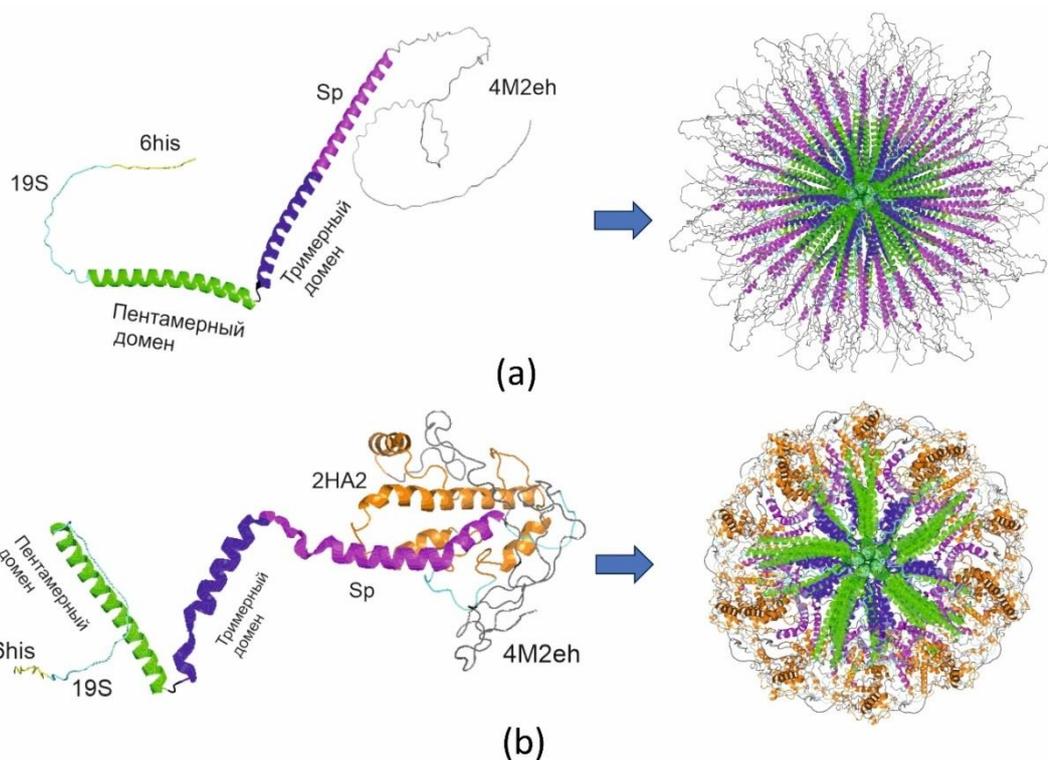


Рисунок 14. Наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP-Sp, несущие целевые антигены вируса гриппа. (a) Сборка частиц 19s-SAP-Sp-4M2eh, несущих консервативную последовательность M2e пептида; (b) Сборка частиц 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, несущих консервативную последовательность M2e пептида и консервативный участок гемагглютинина HA2 вируса гриппа А человека. 3D-модель мономера и сборка наночастиц. Получена с помощью программы AlphaFold v2.3.1, визуализация PyMOL. Шесть гистидинов на N-конце обозначены желтым, 19S-линкер – голубым, пентамерный домен SAP пептида – зеленым, тримерный домен SAP пептида – синим, Sp-спиральный линкер – розовым, 2 копии участка гемагглютинина HA2 – оранжевым, 4 копии M2e пептида – серым.

Дизайн и конструирование искусственных генов, кодирующих рекомбинантные белки 19s-SAP-Sp-4M2eh, 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19s-Sp-4M2eh и 19s-Sp-2HA2-4M2eh

Все гены были получены с использованием стандартных методов генетической инженерии и клонированы в экспрессионном векторе pQE30, что позволяет получать белки с N-концевой гексагистидиновой последовательностью.

Вектор pQE30 19s-Sp-4M2eh

Для получения экспрессионного вектора pQE30 19s-Sp-4M2eh была использована пара синтетических олигонуклеотидов, кодирующая последовательность жесткого спирального линкера Sp с добавлением сайтов рестрикции Ecl136II и EcoRV на 5'- и 3'- конце соответственно. После отжига полученный фрагмент Sp был встроен по сайту Ecl136II в ранее полученный в нашей лаборатории экспрессионный вектор, кодирующий коровый белок вируса гепатита В с включенным в иммунодоминантную петлю 4-х кратным тандемным повтором M2e пептида вируса гриппа человека pQE60 HBc/19s-4M2eh-19s/HBc, где фрагмент 4M2e был фланкирован с двух сторон 19s глицин-богатыми линкерными последовательностями и сайтами

рестрикции Ecl136II и EcoRV (Ravin *et al.*, 2015). Из этого вектора вырезали фрагмент 19s-Sp-4M2eh*(BamHI–EcoRV), который клонировали в экспрессионный вектор pQE30 по сайтам BamHI и HincII (Рис. 15).

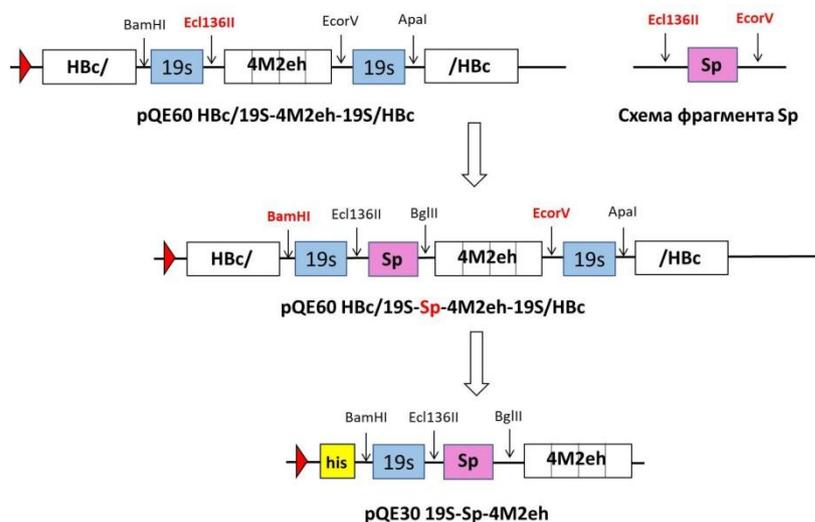


Рисунок 15. Получение вектора pQE30 19S-Sp-4M2eh, позволяющего экспрессировать рекомбинантный белок 19S-Sp-4M2eh.

Вектор pQE30 19s-SAP-Sp-4M2eh

Фрагмент SAP*Ecl136II, EcoRV из плазмиды pQE30 his-SAP был клонирован в плазмиду pQE30 his-19S-Sp-4M2eh по сайту рестрикции Ecl136II (Рис. 16).

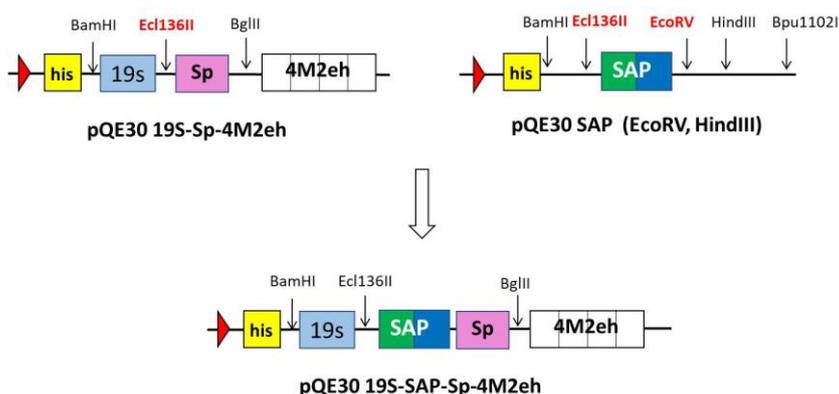


Рисунок 16. Получение вектора pQE30 19S-SAP-Sp-4M2eh, позволяющего экспрессировать рекомбинантный белок 19S-SAP-Sp-4M2eh.

Векторы pQE30 19s-Sp-2HA2-4M2eh и pQE30 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh

Фрагмент, кодирующий HA2, был получен в результате PCR-амплификации с использованием праймеров (последовательности приведены в разделе Материалы и методы), которые обеспечили введение глицинового линкера GS на N-конец гемагглютинаина и сайты

BglII с обоих концов полученного фрагмента. В качестве матрицы использовали вектор pEff Flg-HA2-4M2e (Blokhina *et al.*, 2020). Полученный ПЦР фрагмент клонировали в векторы pQE30 19s-Sp-4M2eh и pQE30 19s-SAP-Sp-4M2eh между последовательностью жесткого спирального линкера Sp и тандемным повтором 4M2e по сайту BglII (Рис. 17).

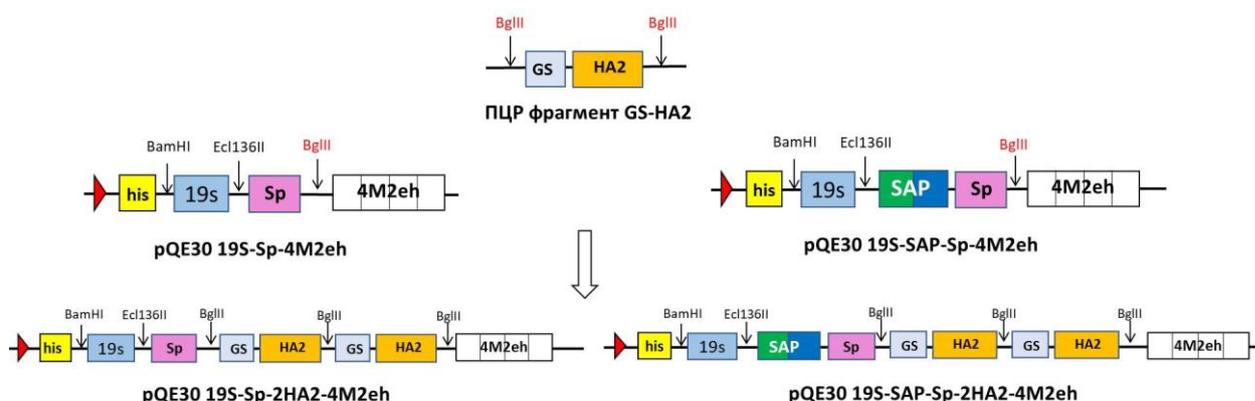


Рисунок 17. Получение векторов pQE30 19S-Sp-2HA2-4M2eh и pQE30 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh.

Полученные плазмиды позволили экспрессировать рекомбинантные белки 19s-Sp-4M2eh, 19s-SAP-Sp-4M2eh, 19s-Sp-2HA2-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, содержащие 6-гистидиновый таг для возможности очистки с помощью металл-аффинной хроматографии (Рис. 18).

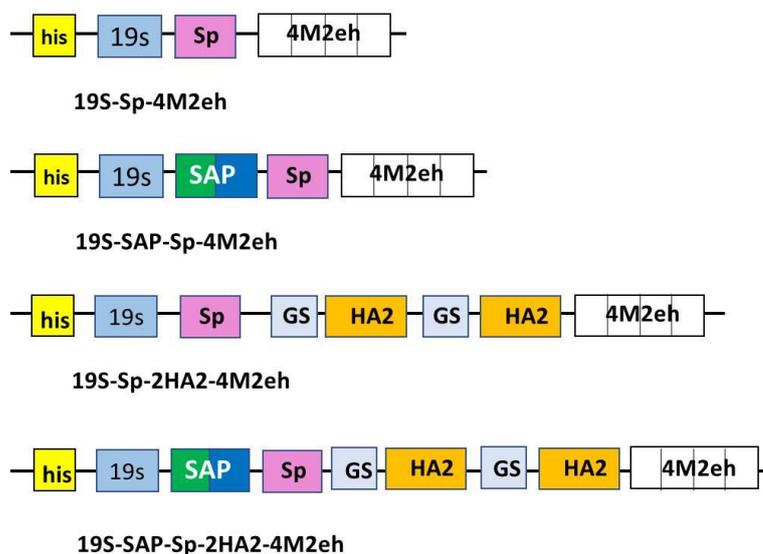


Рисунок 18. Структуры рекомбинантных белков 19s-Sp-4M2eh, 19s-SAP-Sp-4M2eh, 19s-Sp-2HA2-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh.

Получение штаммов-продуцентов *E.coli* и очистка рекомбинантных белков 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh, 19S-Sp-2HA2-4M2eh.

Полученными экспрессионными векторами трансформировали клетки *Escherichia coli* DLT1270. Для индукции экспрессии рекомбинантных белков свежую культуру клеток выращивали в LB среде при 37°C до середины логарифмической фазы роста (оптическая плотность OD ~ 0,5). После чего добавляли IPTG до конечной концентрации 1 mM и продолжали культивировать в течение 4 часов при тех же условиях. Уровень синтеза целевых белков оценивали с помощью SDS-PAGE (Рис. 19).

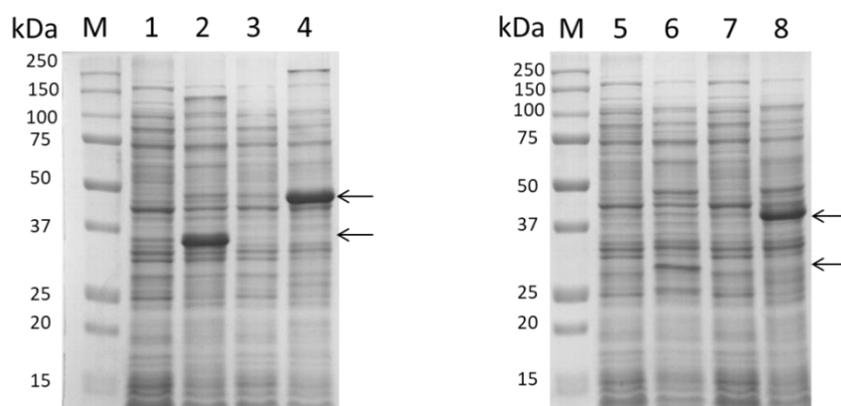


Рисунок 19. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*. SDS-PAGE анализ. М — маркер молекулярной массы (в kDa); 1, 3, 5, 7 - белковый препарат из неиндуцированной культуры; 2 - белковый препарат из индуцированной культуры 19S-SAP-Sp-4M2eh; 4 - белковый препарат из индуцированной культуры 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh; 6 - белковый препарат из индуцированной культуры 19S-Sp-4M2eh; 8 - белковый препарат из индуцированной культуры 19S-Sp-2HA2-4M2eh.

Уровень экспрессии белков с SAP был выше, чем в случае контрольных белков без SAP. Относительно низкий уровень экспрессии наблюдался для белка 19s-Sp-4M2eh, в то время как другие белки экспрессировались на уровнях 10% - 30% от общего количества бактериальных белков (Рис 19).

Выделение рекомбинантных белков проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Анализ очищенных препаратов проводили с помощью SDS-PAGE (Рис. 20(a)).

Рассчитанная молекулярная масса белка 19S-SAP-Sp-4M2eh составляет 25 кДа, однако на SDS-PAGE его видимая масса была ~33-34 кДа (Рис. 20(a)). Вероятно, аномальная подвижность этого белка в SDS-PAGE обусловлена большой долей отрицательно заряженных аминокислотных остатков (15 Asp и 32 Glu из 231 а.о.) (Guan *et al.*, 2015). Для белка 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh наблюдалась аналогичная картина. Его рассчитанная молекулярная масса 40 кДа, на SDS-PAGE электрофорезе его масса ~48-50 кДа (в составе 27 Asp и 46 Glu из 367 а.о.).

В SDS-PAGE рекомбинантные белки с SAP представлены в виде трех полос, одна из которых соответствует мономеру, а другие две соответствуют тримеру и пентамеру. Белки 19S-

Sp-4M2eh, 19S-Sp-2HA2-4M2eh с отсутствием SAP пептида на SDS-PAGE представлены в виде одной полосы (Рис. 20(a)). Очищенные рекомбинантные белки тестировали на способность связываться с антителами к M2e (Рис. 20(b)). Полученные рекомбинантные белки детектируются поликлональными анти-M2e антителами.

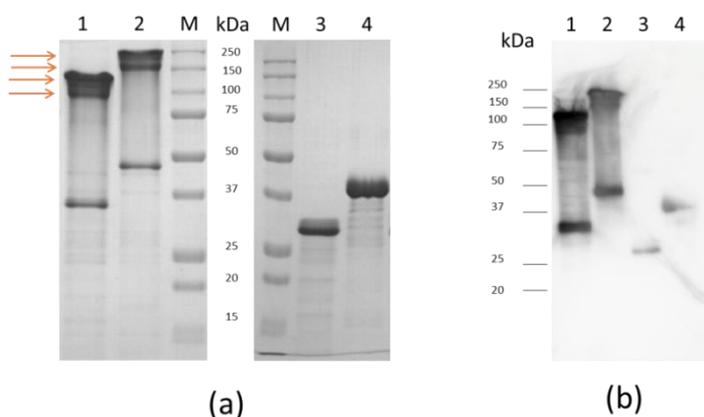


Рисунок 20. (a) Очистка рекомбинантных белков. SDS-PAGE анализ белков. М — маркер молекулярной массы (в kDa). 1, 2, 3, 4 — очищенные препараты 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh и 19S-Sp-2HA2-4M2eh соответственно. (b) Вестерн-блот анализ взаимодействия очищенных белков с анти-M2e антителами. Положения и размеры (в kDa) маркеров молекулярной массы показаны слева. 1, 2, 3, 4 — очищенные препараты 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh и 19S-Sp-2HA2-4M2eh соответственно.

Рефолдинг белков и структурная характеристика препаратов

Для рефолдинга, очищенные белки диализовали против 10 mM PBS со ступенчатым понижением концентрации мочевины: 4M, 2M, 1M, 0,5M. Финальный этап диализа проводили против 10 mM PBS pH 7.4. Полученные белки оставались растворимыми после диализа.

С помощью атомно-силовой и электронной микроскопии, а также методом динамического светорассеяния было показано образование белками, содержащими SAP, частиц размером от 20 до 50 нм (Рис. 21, 22). В случае белков 19S-Sp-4M2eh и 19S-Sp-2HA2-4M2eh частицы не наблюдались.

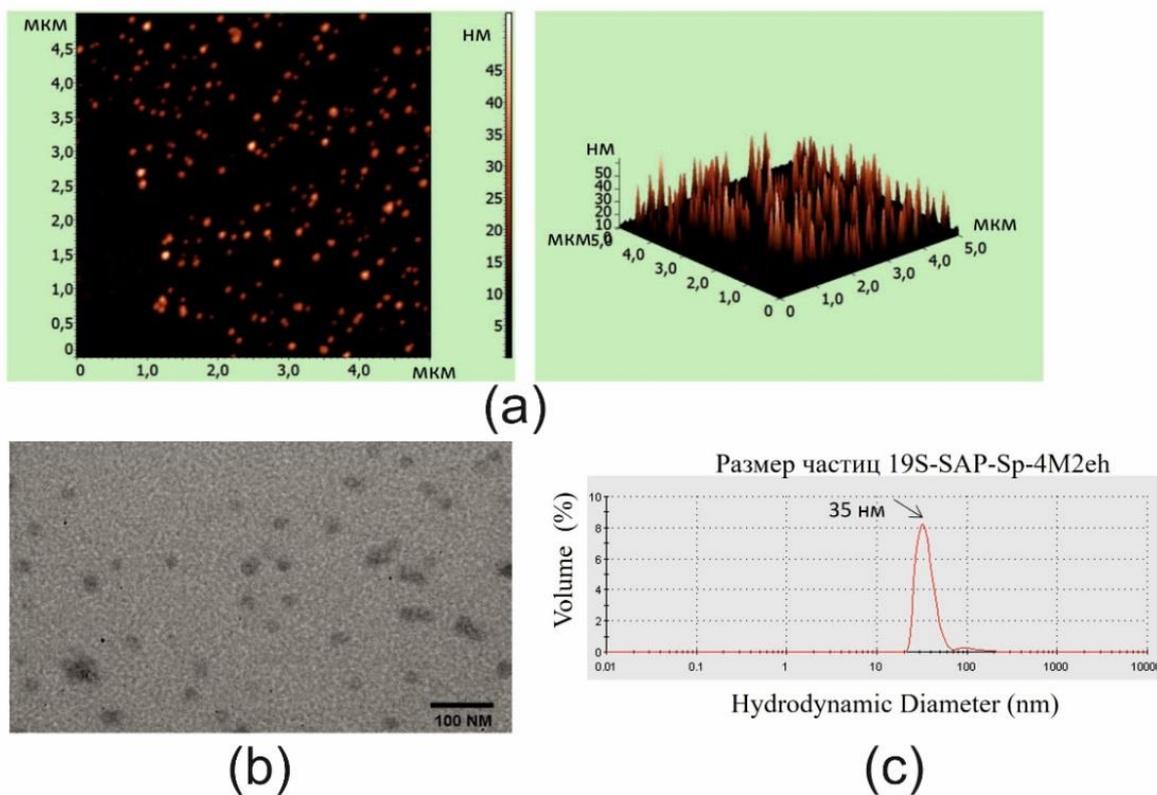


Рисунок 21. Анализ структуры частиц 19S-SAP-Sp-4M2eh с помощью атомно-силовой микроскопии (a), электронной микроскопии (b), анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (c).

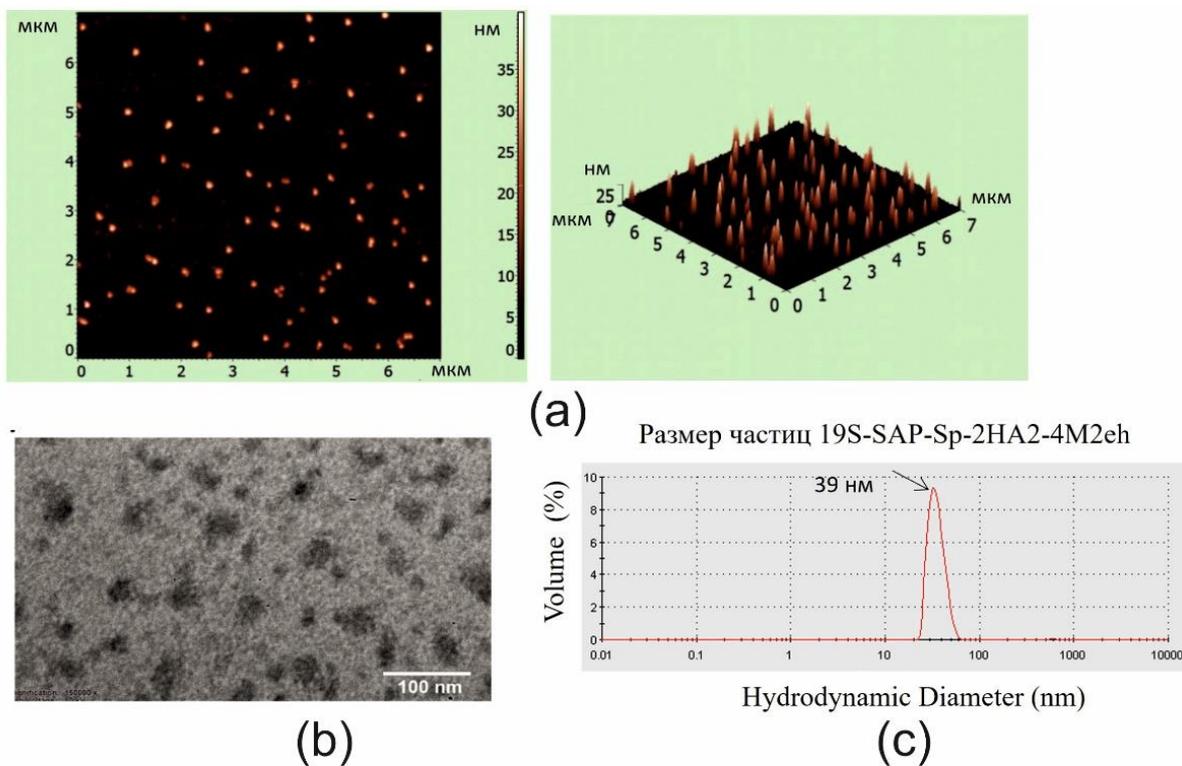


Рисунок 22. Анализ структуры частиц 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh с помощью атомно-силовой микроскопии (a), электронной микроскопии (b), анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (c).

Оценка иммунологических характеристик и протективного действия полученных препаратов

Исследования иммуногенности и протективного действия рекомбинантных белков 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh, 19S-Sp-2HA2-4M2eh были проведены в ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

Группы опытных мышей (линия Balb/c, по 35-40 мышей в каждой группе) трехкратно иммунизировали препаратами в дозе 50 мкг на мышь интраназально без адьювантов. Контрольной группе вводили PBS. Для определения титров антител и исследования клеточного иммунного ответа через 2 недели после третьей иммунизации получали образцы сывороток крови, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), суспензии легких и селезенки.

Методом иммуноферментного анализа с использованием синтетического пептида G-37 (SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD), который соответствует консенсусной последовательности M2e вируса гриппа человека, определяли титр специфических антител к эпитопу M2e в сыворотках мышей. Также определяли титры к цельному вирусу гриппа A/H3N2, так как выбранная для конструирования рекомбинантных белков последовательность HA2 является высококонсервативной в вирусах гриппа 2-й филогенетической группы (Stepanova *et al.*, 2018).

Интраназальная иммунизация вызвала как местный, так и системный иммунный ответ (Рис. 23). Иммунизация мышей препаратами 19s-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh инициирует образование иммуноглобулинов IgG, специфичных к M2e вируса гриппа человека. Титры анти-M2e IgG в сыворотках и в БАЛ у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, содержащими SAP, были значительно выше, чем в группах мышей, иммунизированных контрольными белками без SAP ($p < 0,01$). Та же картина наблюдалась для M2e-специфических иммуноглобулинов типа A (IgA) в БАЛ ($p < 0,001$). Статистически значимых различий не было в титрах антител против M2e между группами, иммунизированных 19s-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh как в сыворотках, так и в БАЛ (Рис. 23). Разницы в индукции уровней антител против M2e не было и у мышей, иммунизированных контрольными препаратами без SAP пептида 19s-Sp-4M2eh и 19s-Sp-2HA2-4M2eh.

Титры вирус-специфических IgG были намного выше у мышей, иммунизированных 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, чем у всех других групп, включая группу, иммунизированную аналогичным белком, но без SAP. Следовательно, как присутствие антигена HA2, так и способность белка образовывать наноразмерные частицы являются важными факторами для индукции вирус-специфического иммунного ответа.

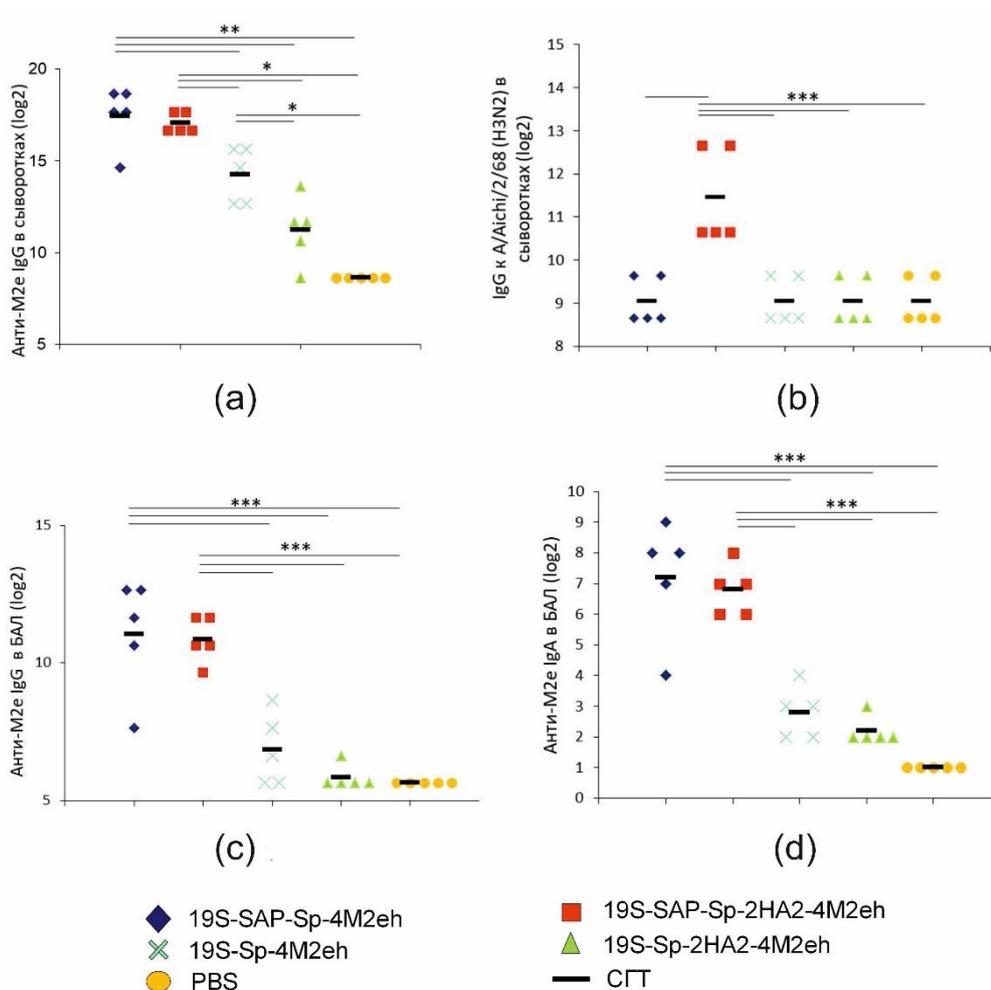


Рисунок 23. Титры антител в сыворотках и в БАЛ после третьей иммунизации мышей препаратами 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh, 19S-Sp-2HA2-4M2eh. (a) титры анти-M2e IgG в сыворотках крови; (b) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в сыворотках крови; (c) титры анти-M2e IgG в БАЛ; (d) титры анти-M2e IgA в БАЛ; Данные представлены в виде средних геометрических титров (СГТ) и значений, наблюдаемых у отдельных мышей. Указаны статистически значимые различия между экспериментальными группами (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

Для изучения формирования Т-клеточного ответа как наиболее перспективный с точки зрения сильного антительного ответа и присутствия как M2e, так и HA2 антигенов вируса гриппа, был выбран препарат 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh. Т-лимфоциты, выделенные из селезенки иммунизированных и контрольных мышей (PBS), через две недели после последней иммунизации, анализировали на активацию клеток на пептид M2e и вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) с использованием внутриклеточного цитокинового окрашивания (ICS) (Рис. 24).

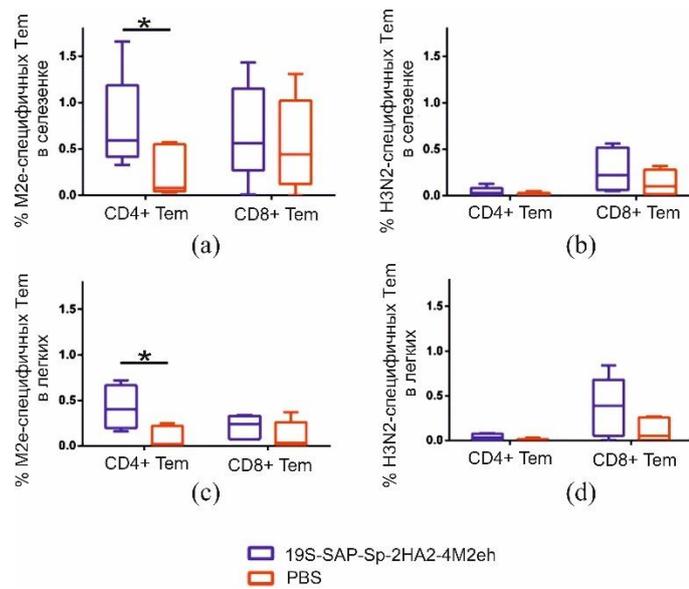


Рисунок 24. Антиген-специфический Т-клеточный ответ в селезенке (a, b) и легких (c, d) иммунизированных мышей. Т-клетки стимулировали пептидом M2e (a, c) или вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (b, d). Данные для экспериментальной (19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh) и контрольной (PBS) группы показаны синим и красным прямоугольниками соответственно. Данные представлены в виде графиков Тьюки. Указаны значения р между группами (*, $p < 0,05$).

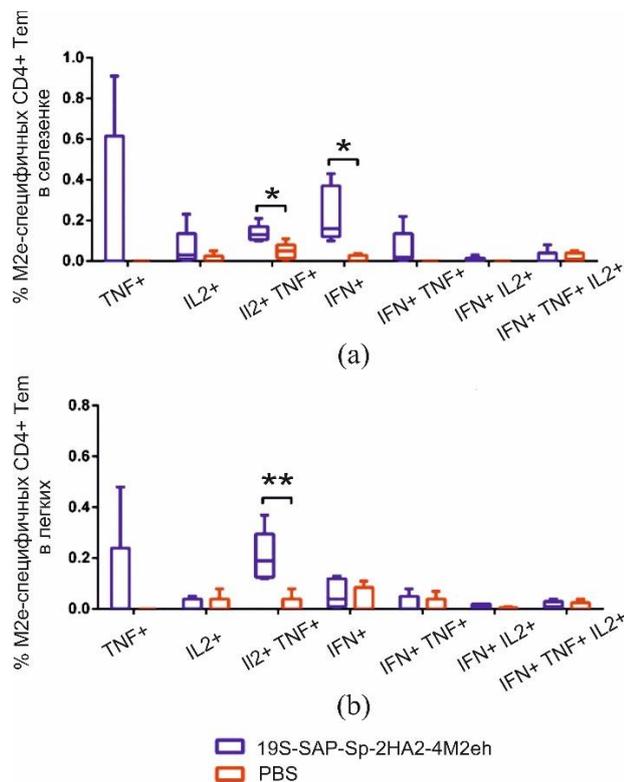


Рисунок 25. Цитокиновый профиль M2e-специфичных CD4+ Tem-клеток в селезенке (a) и легких (b) после интраназальной иммунизации. Данные для экспериментальной (19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh) и контрольной (PBS) группы показаны синим и красным прямоугольниками соответственно. Данные представлены в виде графиков Тьюки. Указаны значения р между группами (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Рекомбинантный белок 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh индуцировал образование выявляемых в селезенке и легких клеток CD4⁺em – поли- и монопродукторов цитокинов (IL-2 и TNF; IFN- γ), специфичных к M2e пептиду (Рис. 24, 25).

Доля M2e-специфичных CD4⁺ Tem-клеток увеличилась в группе иммунизированных препаратом мышей (в среднем 0,76% в селезенке и 0,42% в легких) по сравнению с контрольной группой (0,25% и 0,09% соответственно). Измеренные количества M2e-специфичных CD8⁺ Tem и вирус-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Tem-клеток были почти идентичны между экспериментальной и контрольной группой. Оценка способности антиген-специфичных T-клеток продуцировать цитокины (IL-2, TNF- α и IFN- γ) показала, что популяция специфичных к M2e CD4⁺ Tem-клеток в селезенке была преимущественно одиночно-продуцирующими IFN- γ ⁺ CD4⁺ клетками (0,23%) и мульти-продуцирующими IL-2⁺/TNF- α + CD4⁺ Tem (0,14%), и их доли были больше, чем в контроле (0,17% и 0,05% соответственно) (Рис. 25). В легких мышей популяция M2e-специфичных CD4⁺ Tem-клеток (0,21%), была продуцирующая IL-2⁺/TNF- α ⁺ (Рис. 25).

Протективное действие препаратов анализировали по динамике гибели иммунизированных мышей после заражения вирусами гриппа человека A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 10LD50 или A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4LD50. Защита на уровне 90-100% наблюдалась у животных, иммунизированных 19S-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (Рис. 26). Такой защитный эффект рекомбинантных частиц SAP также сопровождается более быстрым восстановлением веса мышей после заражения по сравнению с препаратами без SAP пептида.

Для сравнения, у мышей, иммунизированных контрольным белком 19S-Sp-4M2eh, который не может образовывать наночастицы, выживаемость после заражения 10 LD50 штамма A/PR/8/34 (H1N1) составила всего 40%. Наблюдалась значительная потеря веса (до 20% на восьмой день после заражения) и медленное выздоровление выживших мышей. Мыши, которым вводили PBS, не были защищены от инфекции (100% летальность).

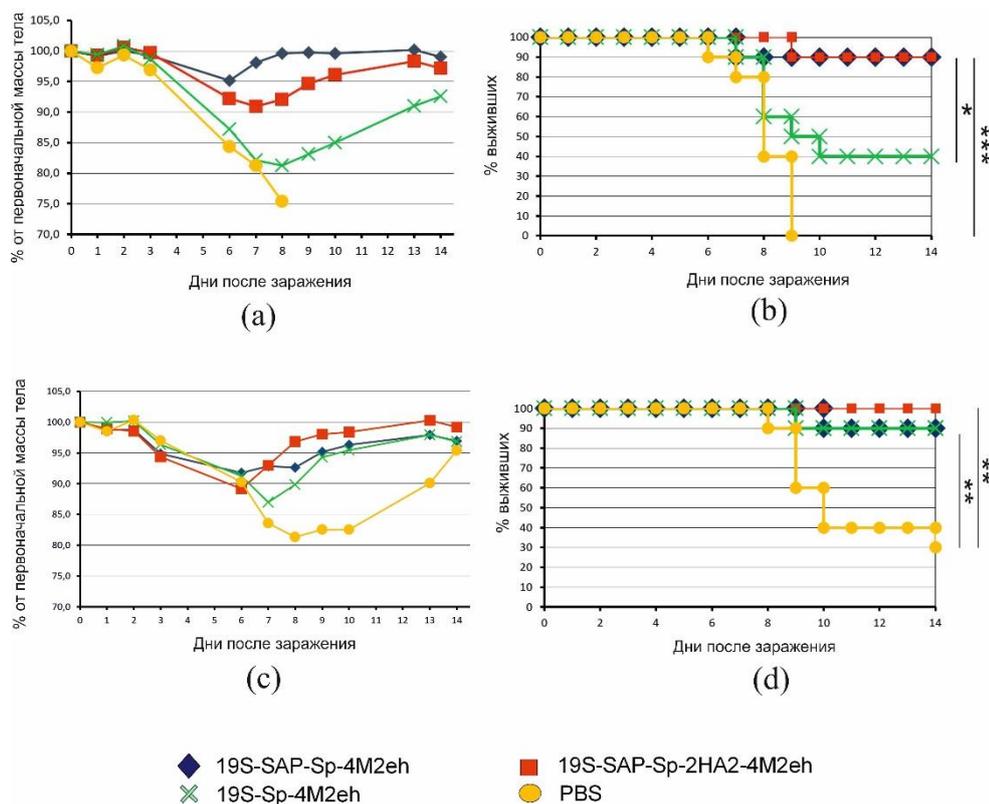


Рисунок 26. Динамика массы тела (а, с) и гибели (b, d) мышей после заражения вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (а, b) в дозе 10LD50 и A/Aichi/2/68 (H3N2) (с, d) в дозе 4LD50. Массу тела и выживаемость контролировали ежедневно в течение 14 дней. Указаны статистически значимые различия между экспериментальными группами (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

Высокий защитный эффект рекомбинантных белков с SAP пептидом подтверждается также существенным снижением на 6-ой день болезни титров вирусов гриппа в легких у мышей иммунизированных рекомбинантными наночастицами на основе SAP по сравнению с мышами контрольных групп, иммунизированных 19S-Sp-4M2eh или PBS (таблица 6).

Таблица 6. Вирусовыделение из легких мышей на 6-е сутки после заражения вирусами гриппа

Группа	Препарат	Вирусы гриппа	Репродукция вируса в легких, lg ТЦД50
1	19S-SAP-Sp-4M2eh	A/PR/8/34 (H1N1) 10LD	0,65+
		A/Aichi/2/68 (H3N2) 4LD	0,90**×
2	19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh	A/PR/8/34 (H1N1) 10LD	0,65+
		A/Aichi/2/68 (H3N2) 4LD	1,25*
3	19S-Sp-4M2eh	A/PR/8/34 (H1N1) 10LD	1,5
		A/Aichi/2/68 (H3N2) 4LD	3,00
4	PBS	A/PR/8/34 (H1N1) 10LD	1,44
		A/Aichi/2/68 (H3N2) 4LD	3,81

** достоверное различие между группами 1 и 4 $p=0,0042$

* достоверное различие между группами 2 и 4 $p=0,0153$

× достоверное различие между группами 1 и 3 $p=0,022$

+ достоверное отличие от группы 4 $p=0,0158$

Таким образом, самособирающиеся частицы, несущие консервативные антигенные детерминанты M2e и HA2 вируса гриппа А, показали способность индуцировать гуморальный и Т-клеточный ответ, который способен защитить животных в случае заражения вирусами гриппа.

1.3. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, содержащих M2e пептид, консервативную последовательность второй субъединицы гемагглютинина HA2, консервативные последовательности нуклеопротеина NP и Т-хелперный эпитоп PADRE, характеристика их иммуногенности и протективного действия

На следующем этапе работы для расширения спектра иммунного ответа против консервативных антигенов вируса гриппа А в состав частиц на основе SAP пептида, несущих M2e и HA2, были добавлены участки нуклеопротеина NP (а.о.255-275 и 335-350). Эти фрагменты NP содержат цитотоксические (CTL) эпитопы и были использованы в разработках нескольких пептидных универсальных противогриппозных вакцин (Multimeric-001, FLU-v). Для дополнительной стимуляции Т-клеточного иммунного ответа в состав рекомбинантных белков был включен Т-хелперный эпитоп PADRE (Рис. 27).

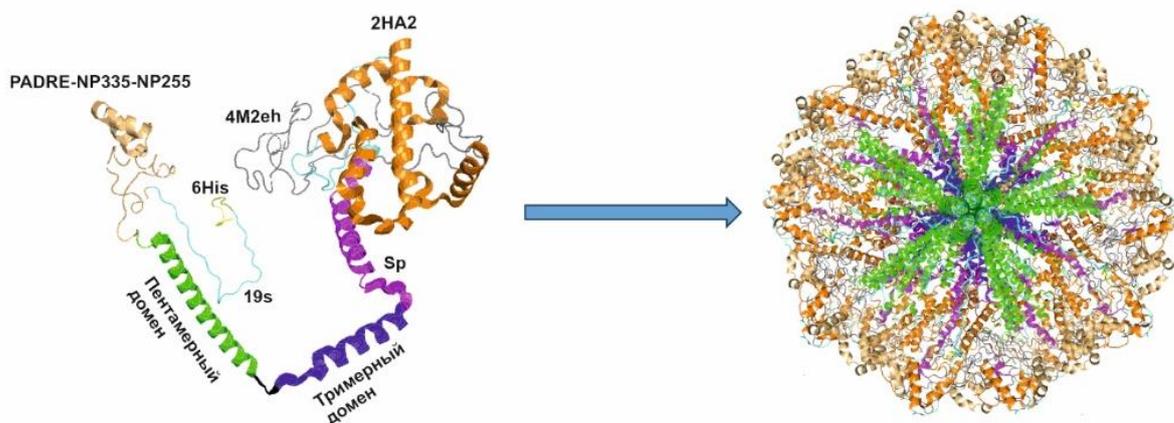


Рисунок 27. Структура частиц 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, несущих M2e пептид, консервативный участок гемагглютинина HA2, два участка нуклеопротеина (а.о. 255-275 и 335-350) вируса гриппа, а также Т-хелперный эпитоп PADRE. Показана 3D-модель мономера и наночастицы. Структура получена с помощью программы AlphaFold v2.3.1, визуализация PyMOL. Шесть гистидинов на N-конце обозначены желтым, 19S-линкер – голубым, пентамерный домен SAP пептида – зеленым, тримерный домен SAP пептида – синим, Sp-спиральный линкер – розовым, 2 копии участка гемагглютинина HA2 – оранжевым, 4 копии M2e пептида – серым, PADRE-NP335-NP255 – бежевым.

Дизайн и конструирование искусственных генов, кодирующих рекомбинантные белки 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh.

Поскольку предполагается, что как N-, так и C-концевые области SAP пептида экспонируются на поверхности наночастиц, оба конца были использованы для вставок целевых

пептидов. На N-конце пентамерного домена SAP были размещены два участка нуклеопротеина и эпитоп PADRE, фланкированные дилизиновыми линкерами. На С-конце SAP – 4 копии M2e пептида и 2 копии HA2. Контрольный белок имел аналогичный дизайн, но не содержал SAP. На N-конце рекомбинантных белков расположены шесть гистидинов для очистки методом металл-аффинной хроматографии.

В ходе работы для получения генетических конструкций целевых белков были использованы синтетические гены или олигонуклеотиды, кодирующие следующие фрагменты белков (аминокислотные последовательности): NP255-275 (DLIFLARSALILRGSVANKS) – эпитоп из нуклеопротеина, NP335-350 (SAAFEDLRVLSFIRGY) – эпитоп из нуклеопротеина, PADRE (AKFVAAWTLKAAA) - универсальный Т-хелперный эпитоп.

В качестве основы для получения искусственных генов был использован ранее полученный вектор pQE30 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh. Последовательность PADRE-NP335-NP255 с введенными сайтами Ecl136II на одном конце и EcoRV на другом была клонирована в вектор pQE30 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh между 19s линкером и SAP по сайту Ecl136II. Для получения контрольного белка без SAP фрагмент PADRE-NP335-NP255 ввели аналогичным способом в вектор pQE30 19s-Sp-2HA2-4M2eh между 19s и Sp линкерами по сайту Ecl136II (Рис. 28, 29).

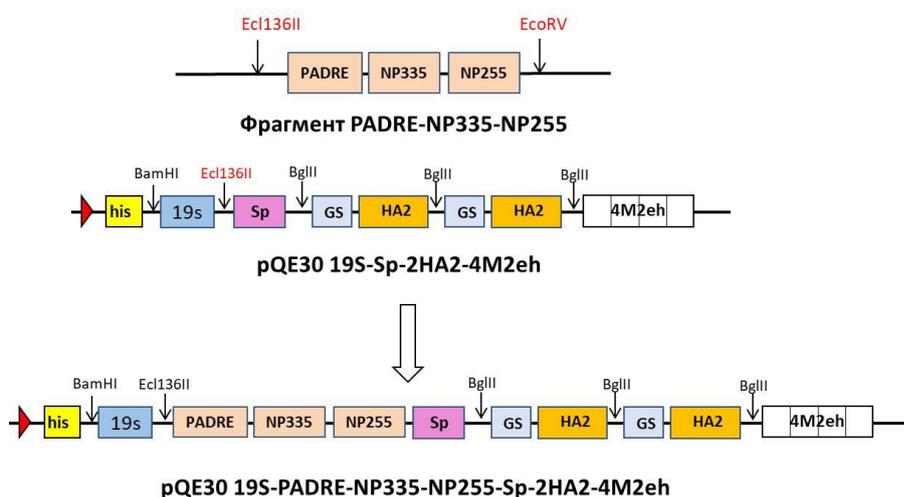


Рисунок 28. Получение вектора pQE30 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh.

Рекомбинантные белки очищали с помощью никель-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях (Рис. 31(a)). Белки также идентифицировали с помощью метода вестерн-блоттинга с использованием антител против M2e (Рис. 31(b)). Рассчитанная молекулярная масса белка 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh - 47 кДа, что примерно соответствует молекулярной массе белков в SDS-PAGE. Для белка 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh рассчитанная молекулярная масса белка - 39 кДа. В SDS-PAGE его масса была ~45 кДа. В отличие от контрольного белка без SAP пептида, для белка с SAP пептидом было характерно наличие агрегатов в SDS-PAGE, которые могут представлять собой димеры, тетрамеры, пентамеры.

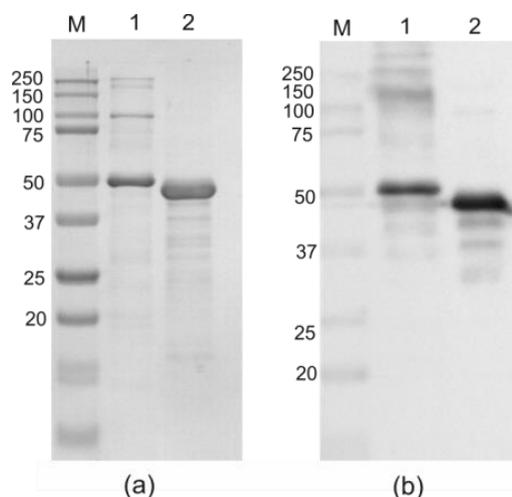


Рисунок 31. (a) Очистка рекомбинантных белков. SDS-PAGE анализ белков. М — маркер молекулярной массы (в kDa). 1, 2 — очищенные препараты 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh соответственно. (b) Вестерн-блот анализ с поликлональными анти-M2e антителами. М — маркер молекулярной массы (в kDa); 1, 2 — очищенные препараты 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh соответственно.

Рефолдинг рекомбинантных белков и сборка наночастиц in vitro

Очищенный в денатурирующих условиях белок 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh подвергали ступенчатому диализу с понижением концентрации мочевины (6, 4, 2, 1, 0 М) в 10 mM PBS pH 7.2-7.4. Очищенный препарат 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, анализировали с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии. Было выявлено, что в процессе рефолдинга рекомбинантный белок собирается в сферические наночастицы размером от 15 до 35 нм (Рис. 32). Согласно измерениям на анализаторе частиц Zetasizer NanoS90 гидродинамический диаметр был 42 ± 7 нм. В случае белка без SAP пептида частиц обнаружено не было (Рис. 32(d)).

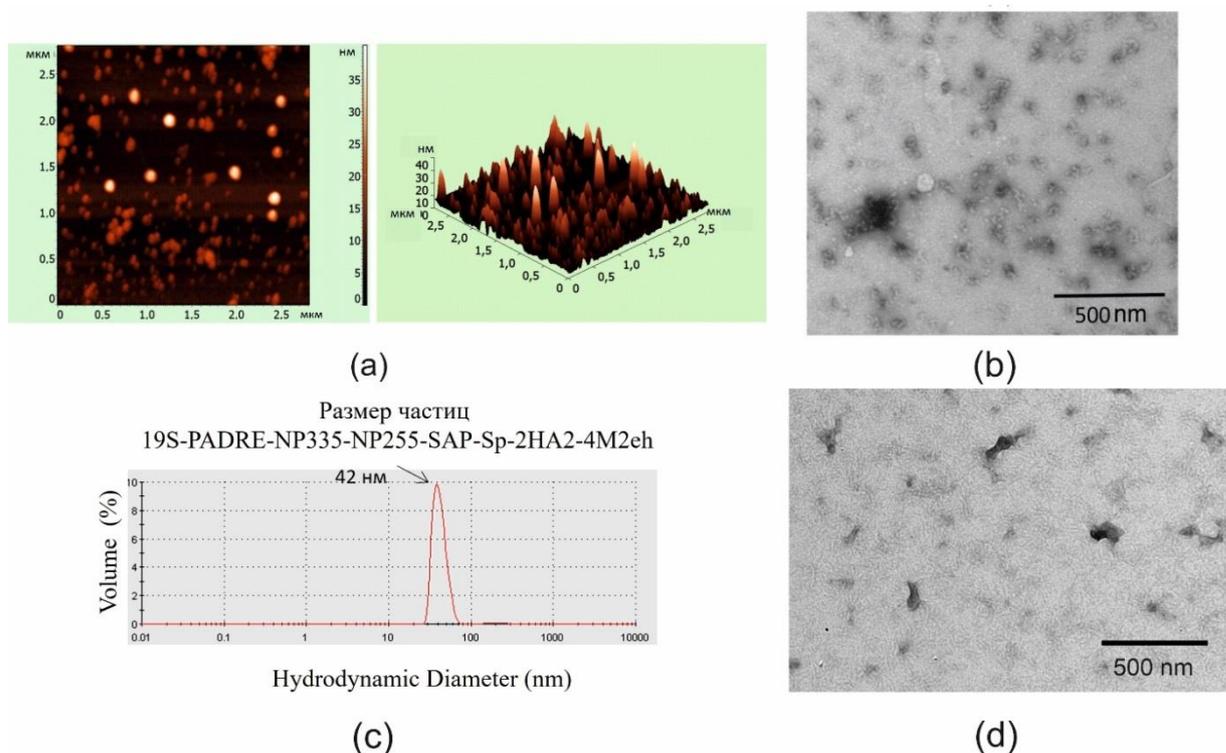


Рисунок 32. Анализ структуры частиц 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh с использованием атомно-силовой микроскопии (а), электронной микроскопии (b), анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (с). Анализ контрольного препарата 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh с использованием электронной микроскопии (d).

Антигенные свойства рекомбинантных наночастиц на основе SAP

Для полученных рекомбинантных наночастиц 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh анализировали доступность M2e пептида для антител, а также степень экранирования SAP присоединенными к нему антигенами с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве контроля использовали наночастицы 19S-SAP-Sp без антигенов вируса гриппа.

На планшеты наносили препараты рекомбинантных наночастиц в двукратных разведениях и проводили инкубацию с M2e – специфическими и SAP – специфическими антителами. Все препараты с M2e-эпитопами взаимодействовали с M2e – специфическими антителами (Рис. 33 (а)), что свидетельствуют о доступности M2e пептида для антител, вероятно, вследствие их локализации на поверхности частиц. Наночастицы 19S-SAP-Sp-4M2eh и 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, содержащие антигены только на С-конце SAP, также взаимодействовали и с SAP-специфическими антителами.

В случае наночастиц 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, в которых антигены были присоединены как на N-, так и на С-конец SAP, такого взаимодействия не наблюдалось (Рис. 33(b)), что свидетельствует об эффективном экранировании

сформированного SAP пептидом «ядра» наночастицы антигенами вируса гриппа, расположенными на ее поверхности.

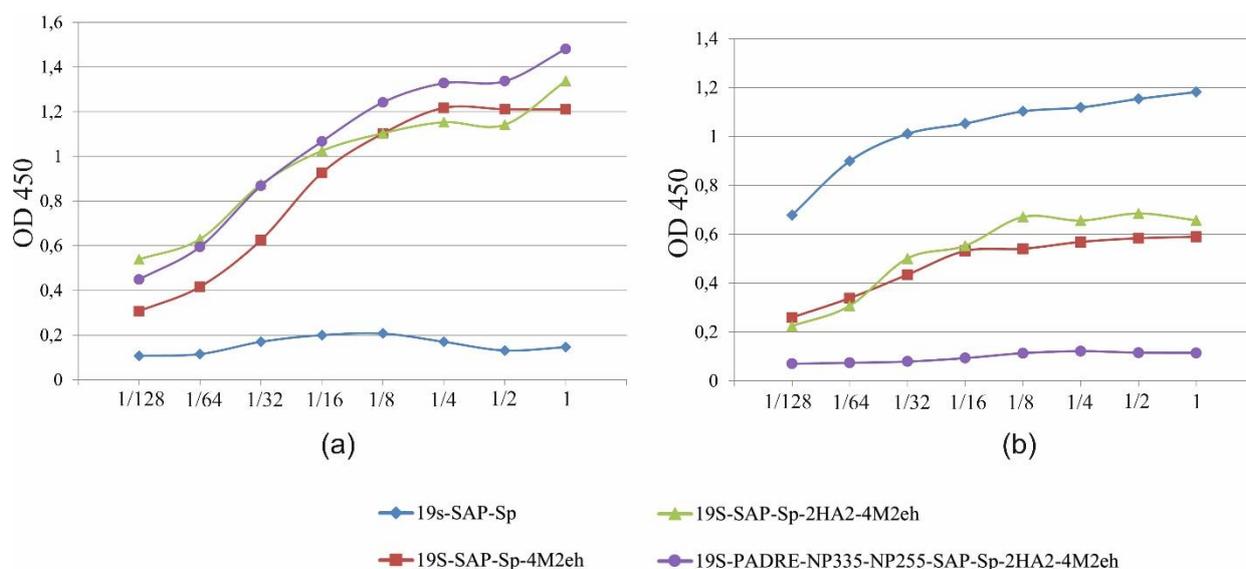


Рисунок 33. Антигенные свойства рекомбинантных наночастиц. (а) Двукратные разведения рекомбинантных белков 19S-SAP-Sp, 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (начиная с 40 мкг/мл) наносили на планшеты, которые затем инкубировали с антителами против M2e. (б) Двукратные разведения рекомбинантных белков 19S-SAP-Sp, 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (концентрация рассчитывалась по количеству SAP-Sp, для препарата 19S-SAP-Sp концентрация начиналась с 35 мкг/мл) наносили на планшеты, которые затем инкубировали с антителами против SAP.

Оценка иммунологических характеристик и протективного действия препаратов

Для характеристики иммуногенности и протективного действия мыши Balb/c были иммунизированы трехкратно подкожно препаратами наночастиц, образованными рекомбинантным белком с SAP пептидом, и контрольным белком 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh. Еще одна группа мышей получила PBS в качестве контроля. Сыворотки и БАЛ были взяты после третьей иммунизации и проанализированы методом ИФА для выявления M2e- и H3N2 -специфичных антител IgG.

Сильный M2e-специфический иммунный ответ развился у обеих опытных групп иммунизированных мышей в сыворотках крови. Титры анти-M2e IgG в сыворотках были значительно выше, чем у контрольной группы, получавшей PBS ($0.0001 < p < 0.001$). Не было выявлено достоверных различий в титрах анти-M2e IgG в сыворотках между двумя опытными группами (Рис. 34 (а)). Однако титры анти-M2e IgG в БАЛ были достоверно выше у группы мышей, иммунизированных SAP-содержащими частицами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, чем у группы мышей, иммунизированных рекомбинантным белком, не содержащим SAP пептид (Рис. 34 (б)).

Индукцированные HA2-специфические IgG антитела распознавали вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) из филогенетической группы 2, и титр вирус-специфических IgG был значительно выше у мышей, иммунизированных наночастицами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, чем во всех других группах. Присутствие антигена HA2 и способность белка образовывать наноразмерные частицы, как и в предыдущем белке 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, важны для формирования вирус-специфического иммунного ответа.

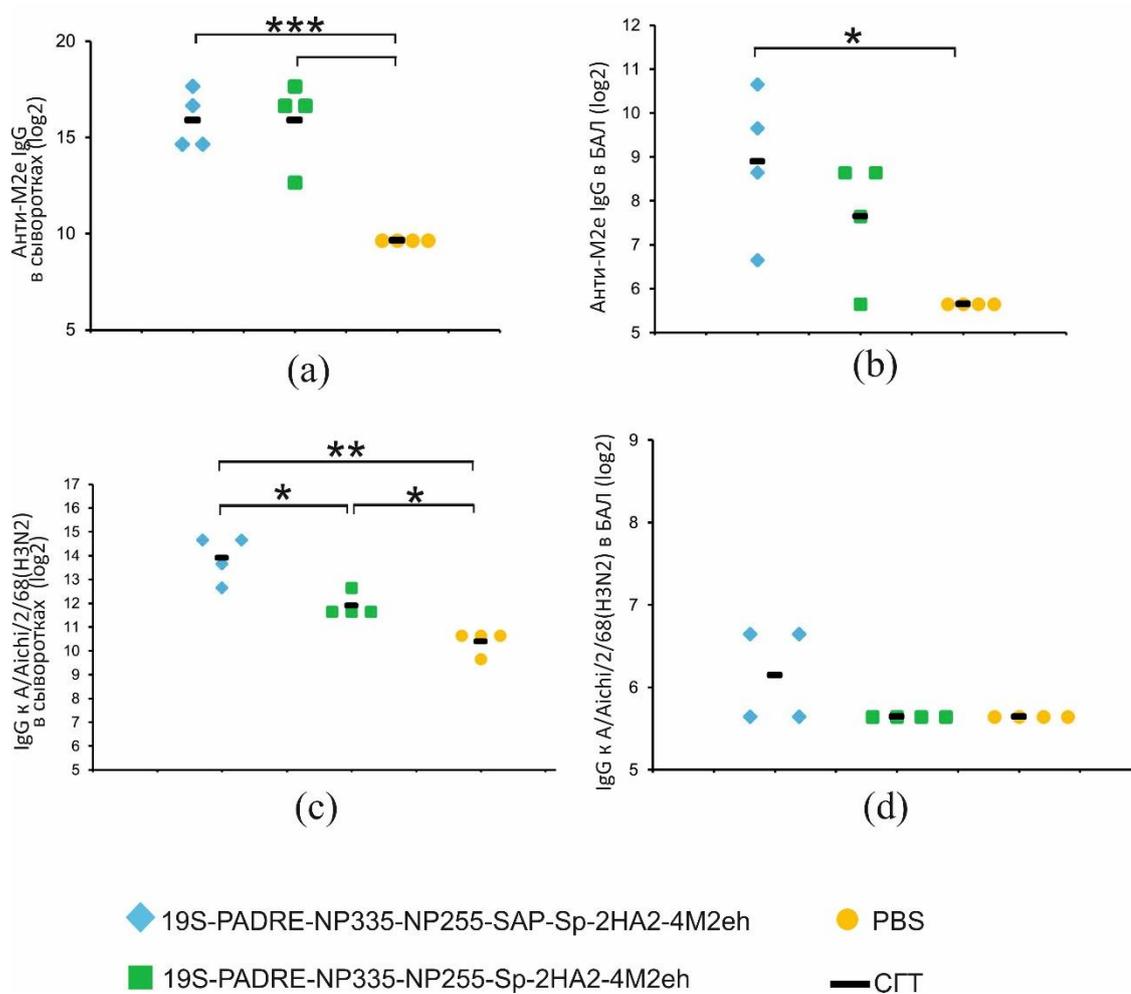


Рисунок 34. Титры антител в сыворотках и в БАЛ после третьей иммунизации мышей препаратами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh. (a) титры анти-M2e IgG в сыворотках крови; (b) титры анти-M2e IgG в БАЛ; (c) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в сыворотках крови; (d) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в БАЛ. Данные представлены в виде средних геометрических титров (СГТ) и значений, наблюдаемых у отдельных мышей. Указаны статистически значимые различия между экспериментальными группами (***) - $0.0001 < p < 0.001$, ** - $0.001 < p < 0.01$, * - $0.01 < p < 0.05$).

Для изучения формирования Т-клеточного ответа у мышей был выбран белок 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, который образовывал наночастицы и вызывал

индукцию не только M2e-специфического, но и вирус-специфического иммунного ответа. Т-лимфоциты, выделенные из селезенок иммунизированных и контрольных мышей C57BL/6 (B6, H2b), через две недели после последней иммунизации, анализировали на активацию клеток на пептид M2e, вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), пептиды из нуклеопротеина (NP255 и NP335) с использованием внутриклеточного цитокинового окрашивания (ICS).

Рекомбинантный белок индуцировал образование M2e-специфичных и вирус-специфических эффекторных Т-клеток памяти (Тem) CD4+ и CD8+ Т-клеток (таблица 7), выявляемых в селезенках мышей C57BL/6 (B6, H2b), в то время как измеренные доли NP-специфических CD4+ и CD8+ Тем-клеток были близки в экспериментальной и контрольной группах.

Таблица 7. Антиген-специфические Тем-клетки в селезенках иммунизированных мышей C57BL/6 (B6, H2b).

Группа мышей	M2e-специфичные Тем		Вирус-специфичные Тем	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
Экспериментальная	0.28 ± 0.07%	0.276 ± 0.11%	5.98 ± 0.63%	13.69 ± 1.74%
Контрольная (PBS)	0.04 ± 0.02%	0.08 ± 0.05%	4.37 ± 0.63%	8.60 ± 1.00%

Затем мы проанализировали способность антиген-специфических Т-клеток продуцировать цитокины (Рис. 35). Популяция M2e-специфичных CD4+ Тем-клеток состояла преимущественно из одиночных продуцентов IL-2 (0,18%) и клеток, продуцирующих два типа цитокинов IL-2/TNF-α (0,07%). Цитокин-продуцирующие M2e-специфичные CD8+ Тем-клетки были в основном представлены двойными продуцентами IL-2/TNF-α (0,11%) и одиночными продуцентами IL-2 (0,12%). Популяция H3N2-специфичных CD8+ Тем-клеток была представлена продуцентами IFN-γ (10,8%).

В случае активации Т-лимфоцитов пептидами NP255 и NP335 из нуклеопротеина NP были выявлены популяции CD4+ и CD8+ Тем-клеток, продуцирующих TNF-α, однако, превышение относительно контроля не было статистически значимым (Рис. 35 (с)).

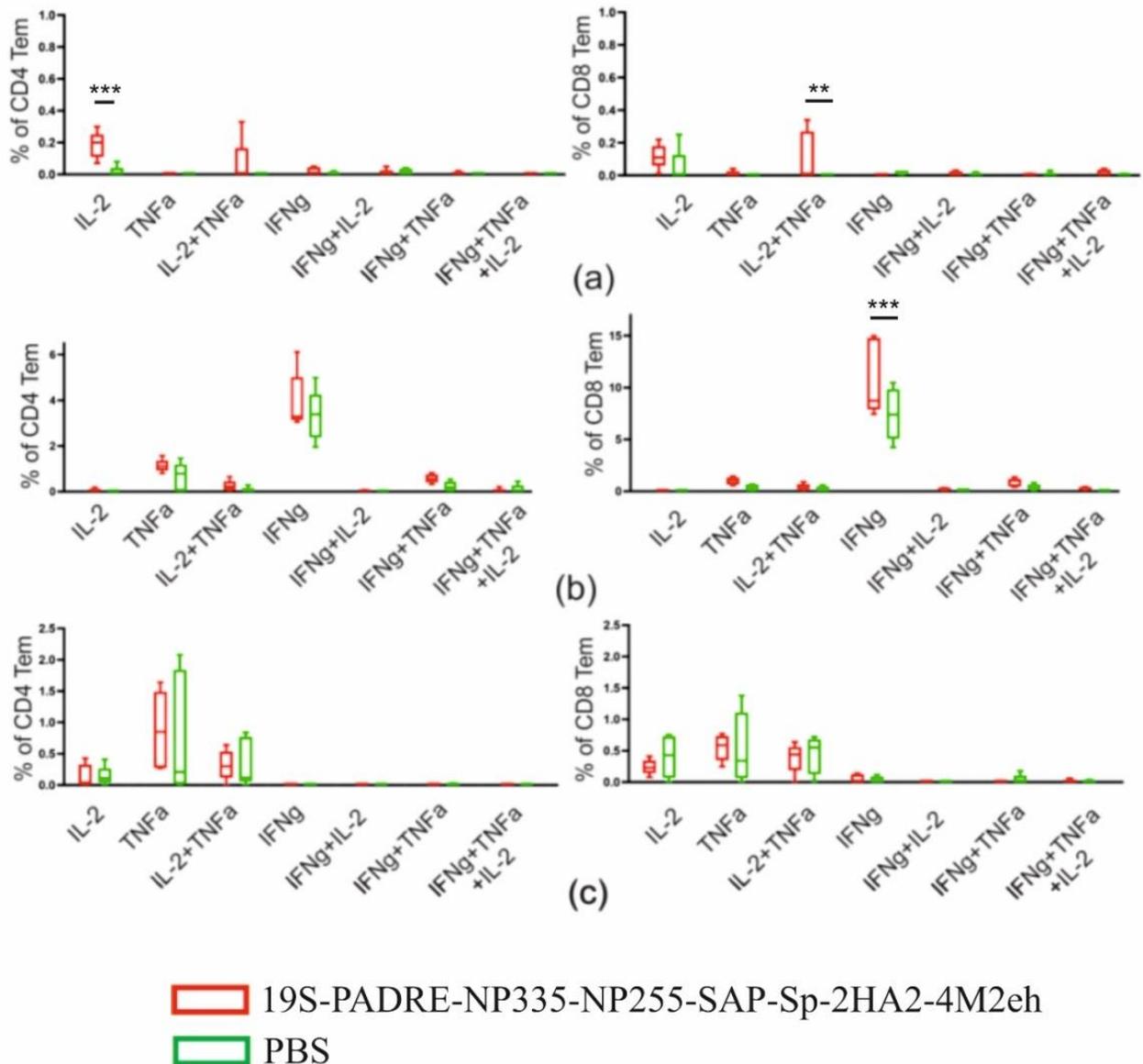


Рисунок 35. Антиген-специфический Т-клеточный ответ в селезенках иммунизированных мышей. Т-клетки были индуцированы с помощью M2e пептида (а), вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (b), пептидов из нуклеопротеина NP (c). Данные представлены в виде графиков Тьюки. Указаны значения Р между группами (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

Одним из способов оценки цитотоксической функции клеток является определение экспрессии мембранного гликопротеина CD107a. Было обнаружено появление вирус-специфических полифункциональных CD8⁺ Тем-клеток, экспрессирующих CD107a и IFN- γ (2,9%) (Рис. 36).



Рисунок 36. Экспрессия мембранного гликопротеина CD107a на вирус-стимулированных Тем-клетках. Указаны значения р между группами (* $0.01 < p < 0.05$).

Для оценки протективного действия рекомбинантных белков иммунизированных и контрольных мышей заражали штаммом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4LD50. Мыши, иммунизированные белком 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh, образующим наночастицы, показали 90% выживаемость и минимальную потерю массы тела (8%). Для сравнения, у мышей, иммунизированных белком 19S-PADRE-NP335-NP255-2HA2-4M2eh без SAP, выживаемость составила 67%, наблюдалась более выраженная потеря веса (до 15%) и более медленное выздоровление (Рис. 37).

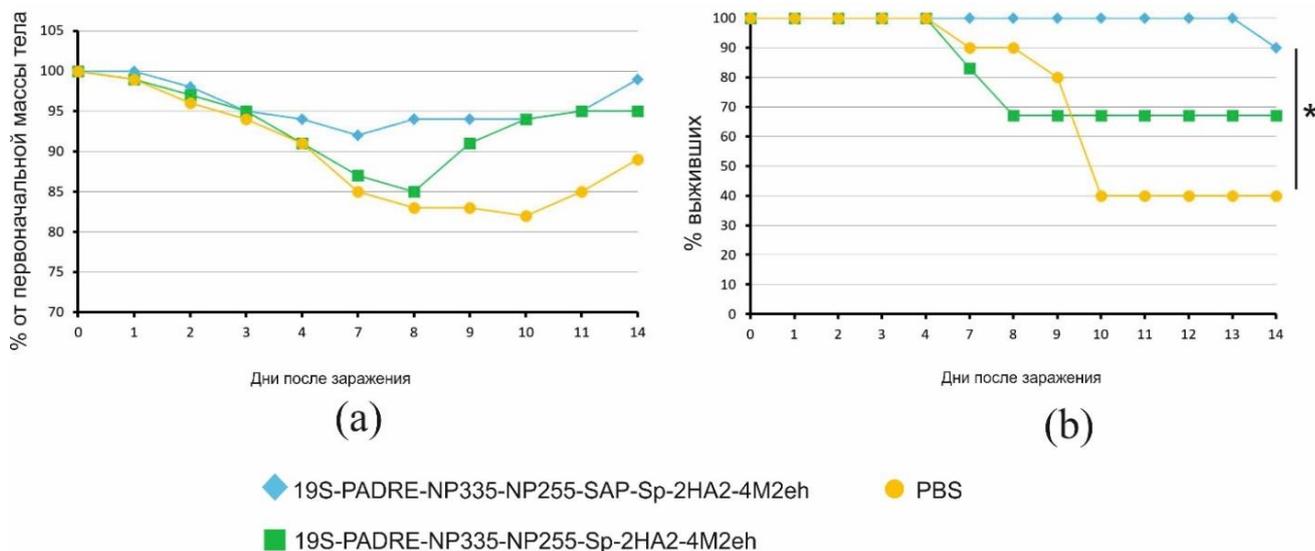


Рисунок 37. Динамика массы тела и гибели мышей после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4xLD50. Массу тела (слева) и выживаемость (справа) контролировали ежедневно в течение 14 дней. Указаны значения р между группами (* $0.01 < p < 0.05$).

2. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, с использованием растительной системы экспрессии.

Для получения рекомбинантных белков используют разные системы экспрессии, включая бактерии, дрожжи, растения и клетки млекопитающих. Растительная система экспрессии имеет ряд потенциальных преимуществ, такие как низкая стоимость, безопасность для человека, простота масштабирования (Liu *et al.*, 2022, Zahmanova *et al.*, 2022). Высокий уровень продукции рекомбинантных белков в растениях может быть достигнут за счет применения транзientных экспрессионных систем, основанных на агроинфильтрации с использованием рекомбинантных вирусных векторов растений (Sainsbury, 2020, Nosaki and Miura, 2021, Mardanova *et al.*, 2017). В этой части работы мы получили рекомбинантные белки на основе самособирающегося пептида в растениях *N. benthamiana*.

2.1. Получение наночастиц на основе SAP пептида

Для получения вектора для экспрессии в растениях в генетическую конструкцию 19s-SAP-Sp с помощью ПЦР амплификации с праймерами Pr-F PalAI_{his} и Pr-R ввели рестрикционные сайты PalAI и Bpu1102I. На первом этапе полученный ПЦР-фрагмент клонировали в векторе pGEM-t (Promega). На втором этапе из полученного вектора по сайтам PalAI и Bpu1102I был вырезан фрагмент 19s-SAP-Sp, одноцепочечный 5'-конец которого (образовавшийся в результате обработки Bpu1102I) был достроен фрагментом Кленова. Этот фрагмент клонировали по сайтам PalAI и SmaI в вектор pEff, предназначенный для экспрессии в растениях (Mardanova *et al.*, 2017). Вектор pEff 19s-SAP-Sp (Рис. 38) переносили в штамм *A. tumefaciens* GV3101.

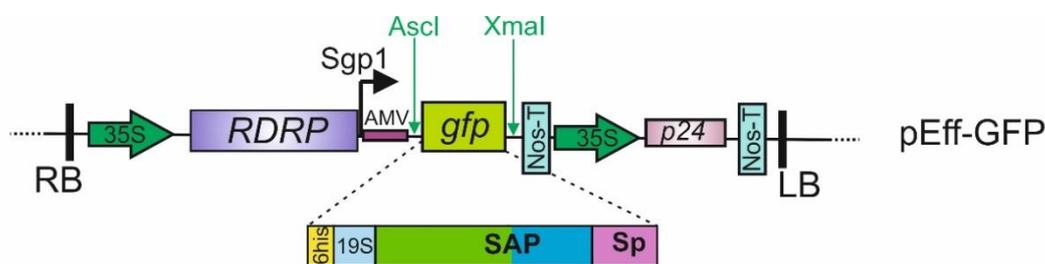


Рисунок 38. Экспрессионный вектор pEff-19S-SAP-Sp.

RDRP - ген РНК-зависимой РНК-полимеразы; Sgp1 - первый промотор субгеномной РНК PVX; AMV - трансляционный энхансер вируса мозаики люцерны; 35S - промотор РНК вируса мозаики цветной капусты; Nos-T - терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; P24 - ген супрессора сайленсинга GRLaV2; his - гексагистидиновая последовательность; 19S - гибкий линкер, богатый глицином; SAP - самособирающийся пептид; Sp - спиральный линкер; RB и LB, правая и левая границы области Т-ДНК.

Листья *N. benthamiana* были инфильтрованы агробактериями, несущими вектор pEff-19S-SAP-Sp. Для контроля синтеза целевого белка фрагменты листа собирали на 1, 2, 3, 4 день после инфильтрации. Через 3-4 дня после инфильтрации (dpi) в зонах инфильтрации наблюдался некроз (Рис. 39 (d)). SDS-PAGE анализ образцов белка из агроинфильтрованных листьев и вестерн-блоттинг (Рис. 39) показали, что 19S-SAP-Sp экспрессировался в растительных клетках на уровне около 100 мкг/г ткани листа.

Рекомбинантный белок был полностью нерастворим, поэтому очистку 19S-SAP-Sp проводили в денатурирующих условиях с помощью металл-аффинной хроматографии. После очистки препарат рекомбинантного белка содержал примесь RuBisCO (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу/оксигеназу), который является мажорным растительным белком (Рис. 39 (c)). В SDS-PAGE рекомбинантный белок представлен в виде мономера и высокомолекулярных агрегатов. После очистки образцы белка подвергали поэтапному диализу против PBS с понижением концентрации мочевины. Выход белка составлял около 40 мкг/г ткани листа.

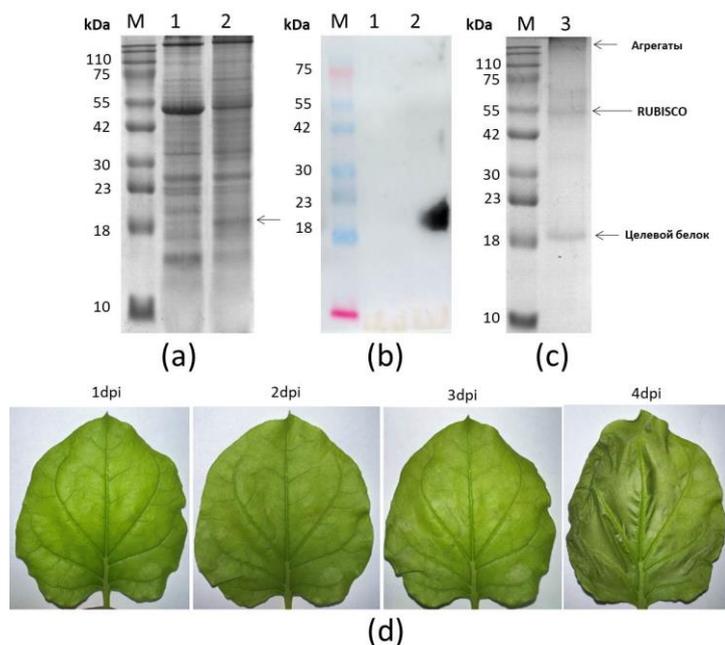


Рисунок 39. Продукция белка 19S-SAP-Sp в растениях *N. benthamiana*. (a), (c) SDS-PAGE и (b) Вестерн-блот с антителами против SAP. М, маркер молекулярной массы (kDa); 1, экстракт белков, выделенных из листа без инфильтрации; 2, экстракт белков, выделенных из листа, инфильтрованного pEff 19S-SAP-Sp; 3, очищенный белок 19S-SAP-Sp. Положение белка 19S-SAP-Sp показано стрелкой. (d) Фотографии листьев *N. benthamiana*, инфильтрованных pEff 19S-SAP-Sp в разные дни.

Белок 19S-SAP-Sp был выделен в денатурирующих условиях с последующим диализом, обеспечившим самосборку наноразмерных частиц *in vitro*. Структура частиц была

проанализирована с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии. Согласно полученным данным, частицы имели диаметр около 15-25 нм (Рис. 40). Таким образом была показана возможность получения наночастиц на основе SAP пептида в растениях *N. benthamiana*.

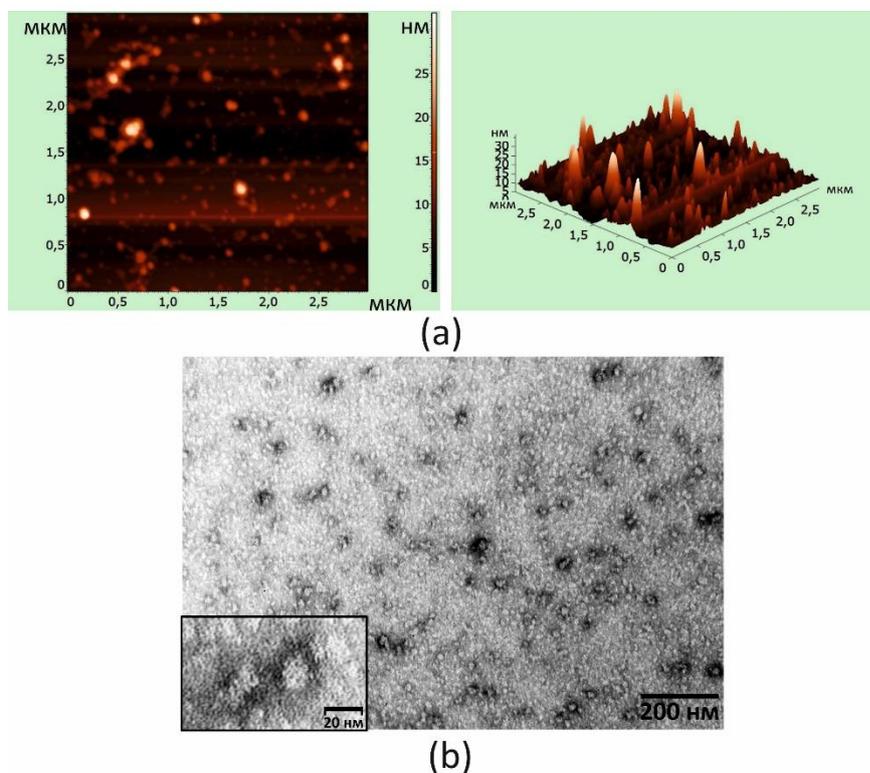


Рисунок 40. Анализ наночастиц, образованных белком 19S-SAP-Sp, полученным в растениях, методами атомно-силовой микроскопии (а) и электронной микроскопии (b).

2.2. Получение наночастиц на основе SAP пептида, несущих антигены вируса гриппа

Для получения рекомбинантных векторов для экспрессии в растениях в гены 19s-SAP-Sp-4M2eh, 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh с помощью ПЦР с праймерами Pr-F PalAI_{his} и Pr-R BpI_{SmaI} ввели концевые рестрикционные сайты PalAI и SmaI. Соответствующие фрагменты ДНК и клонировали в вектор pEff для экспрессии в растениях по тем же сайтам. На следующем этапе полученные векторы вводили в штамм *A. tumefaciens* GV3101. Таким образом, были получены штаммы агробактерий, несущие экспрессионные векторы pEff-19S-SAP-Sp-4M2eh, pEff-19S-SAP-Sp-2HA2-4M2e, pEff-19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (Рис. 41).

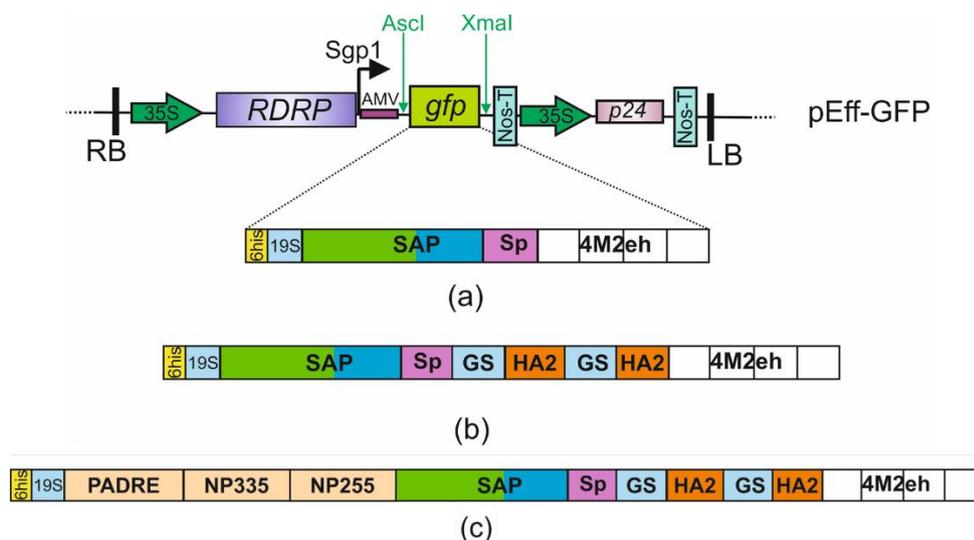


Рисунок 41. Экспрессионные векторы (a) pEff-19S-SAP-Sp-4M2eh; (b) pEff-19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh; (c) pEff-19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh. RDRP - ген РНК-зависимой РНК-полимеразы; Sgp1 - первый промотор субгеномной РНК PVX; AMV - трансляционный энхансер вируса мозаики люцерны; 35S - промотор РНК вируса мозаики цветной капусты; Nos-T - терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; P24 - ген супрессора сайленсинга GRLaV2; his - гексагистидиновая последовательность; 19S- гибкий линкер, богатый глицином; SAP - самособирающийся пептид; Sp - спиральный линкер; 4M2eh - четыре тандемные копии пептида M2e; GS - короткий глициновый линкер; HA2 - копия последовательности участка второй субъединицы гемагглютинаина; PADRE-NP335-NP-255 – последовательность PADRE и участков нуклеопротеина; RB и LB, правая и левая границы области Т-ДНК.

Для экспрессии в растениях листья *N. benthamiana* были инфильтрованы агробактериями, несущими рекомбинантные экспрессионные векторы. Для контроля синтеза целевых белков фрагменты листа собирали на 1, 2, 3 день после инфильтрации.

Образцы белков из агроинфильтрованных листьев были проанализированы с использованием SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителами против M2e (Рис. 42, 43). Белок 19S-SAP-Sp-4M2eh эффективно экспрессировался в растительных клетках на уровне около 80-100 мкг/г ткани листа, тогда как для белков 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh уже на 3 день наблюдалась сильная некротизация листа, а уровень экспрессии был не выше 20 мкг/г ткани листа. Использование белков 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh с низким уровнем экспрессии является нецелесообразным для получения вакцинных препаратов. Поэтому для дальнейшей работы был выбран только белок 19S-SAP-Sp-4M2eh.

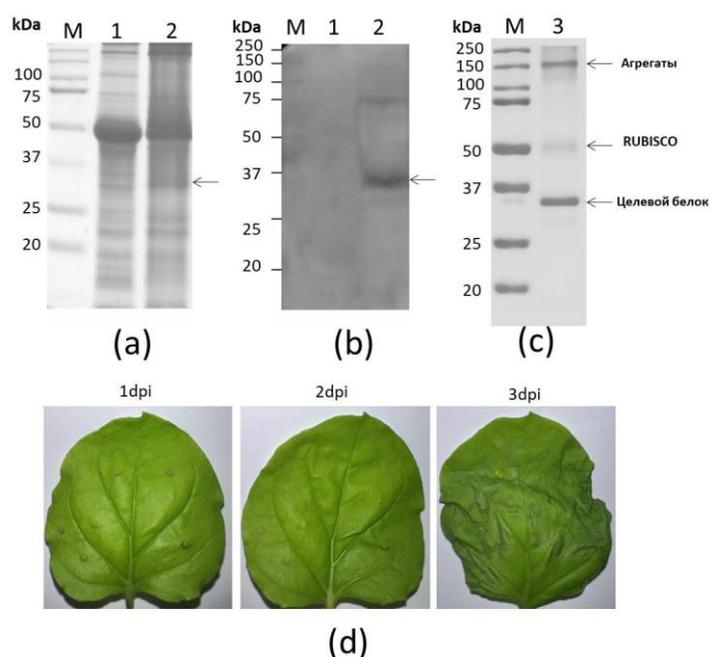


Рисунок 42. Продукция белка 19S-SAP-Sp-4M2eh в растениях *N. benthamiana*. (a), (c) SDS-PAGE и (b) Вестерн-блот с антителами против M2e. М, маркер молекулярной массы (kDa); 1, экстракт белков, выделенных из листа без инфильтрации; 2, экстракт белков, выделенных из листа, инфильтрованного рEff 19S-SAP-Sp-4M2eh; 3, очищенный белок 19S-SAP-Sp-4M2eh. Положение белка 19S-SAP-Sp-4M2eh показано стрелкой. (d) Фотографии листьев *N. benthamiana*, инфильтрованных рEff 19S-SAP-Sp-4M2eh в разные дни.

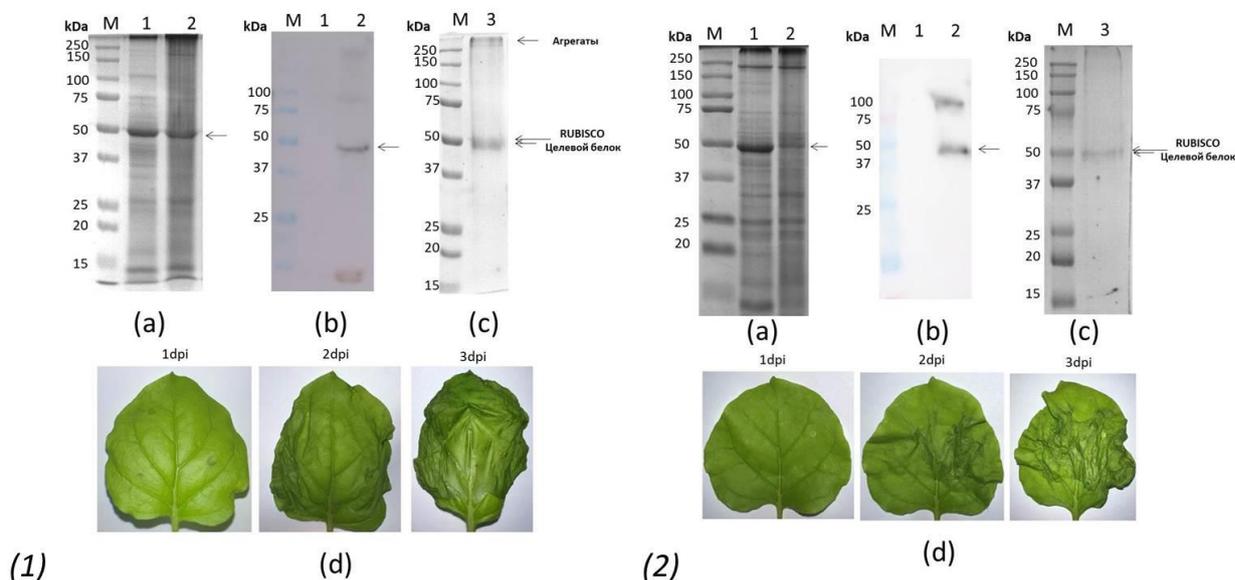


Рисунок 43. Продукция белков 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (1) и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (2) в растениях *N. benthamiana*. (a), (c) SDS-PAGE и (b) Вестерн-блот с антителами против M2e. Дорожки: М, маркер молекулярной массы (kDa); 1, экстракт белков, выделенных из листа без инфильтрации; 2, экстракт белков, выделенных из листа, инфильтрованного вектором, кодирующем целевой белок; 3, очищенные белки. Положение целевых белков показано стрелкой. (d) Фотографии листьев *N. benthamiana*, инфильтрованных рEff 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, рEff 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh в разные дни.

После очистки на сорбенте Ni-NTA белок 19S-SAP-Sp-4M2eh все еще содержал большую примесь растительного белка RuBisCO. Поэтому далее полученный белок был повторно очищен с использованием того же протокола. В результате был получен гомогенный образец растворимого белка с минимальным содержанием RuBisCO (Рис. 42(c)). Выход белка составлял ~ 60 мкг/г ткани листа. Наряду с мономерной формой белка, SDS-PAGE также выявил мультимеры с видимой молекулярной массой около 150 кДа, которые могут представлять собой пентамеры SAP.

Белок 19S-SAP-Sp-4M2eh был выделен в денатурирующих условиях с последующим диализом с поэтапным уменьшением концентрации мочевины, обеспечивающим самосборку наноразмерных частиц *in vitro*. Сборка белка в наноразмерные структуры была проанализирована с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии. Сферические частицы наблюдались обоими методами (Рис. 44). Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии, частицы имели диаметр около 15-25 нм. Размер частиц 19S-SAP-Sp-4M2eh, оцененный с помощью атомно-силовой микроскопии, составил около 15-30 нм.

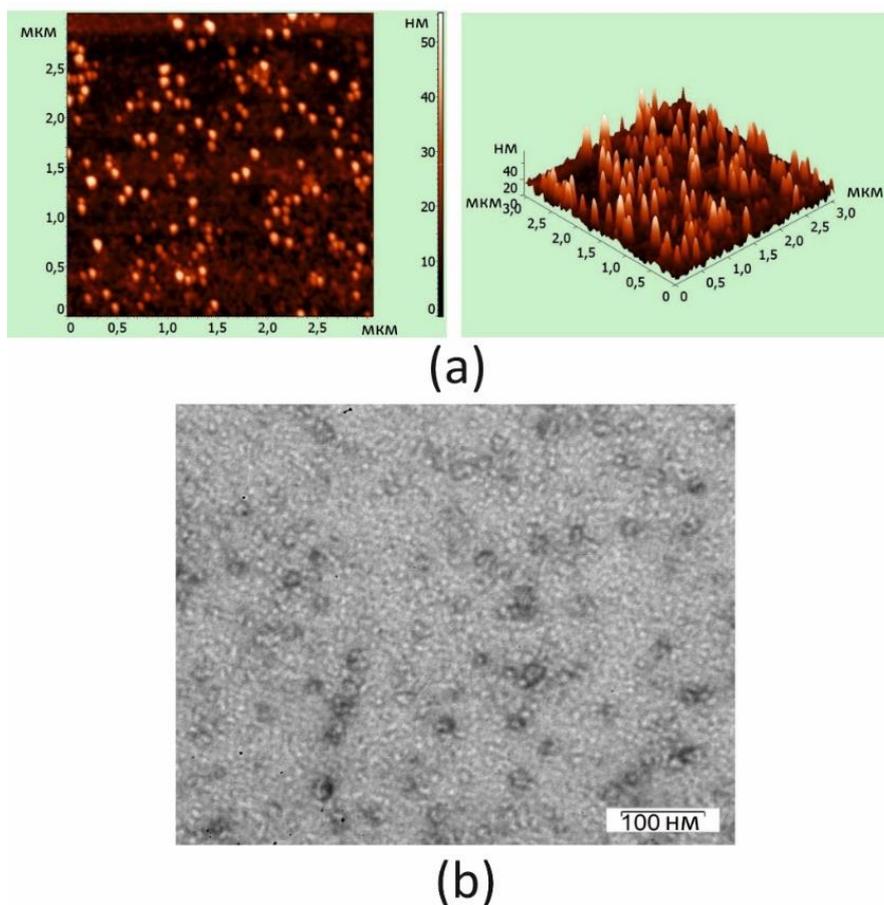


Рисунок 44. Анализ вирусоподобных частиц, образованных белком 19S-SAP-Sp-4M2eh, методами атомно-силовой микроскопии (a) и просвечивающей электронной микроскопии (b).

2.3. Иммуногенность и протективность белка 19S-SAP-Sp-4M2eh, полученного в растительной системе экспрессии.

Для характеристики иммуногенности и протективного действия мышей иммунизировали трехкратно подкожно наночастицами, образованными белком 19S-SAP-Sp-4M2eh. Сыворотки и БАЛ были взяты после третьей иммунизации и проанализированы методом ИФА для выявления антител IgG против M2e и целого вируса гриппа H3N2.

Было обнаружено, что иммунизация 19S-SAP-Sp-4M2eh индуцировала высокие титры M2e-специфического IgG в сыворотке крови и в БАЛ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$ в сыворотках крови и $p < 0,05$ в БАЛ) (Рис. 45(a), (b)). Однако индукции вирус-специфических IgG не наблюдалось (Рис. 45(c), (d)).

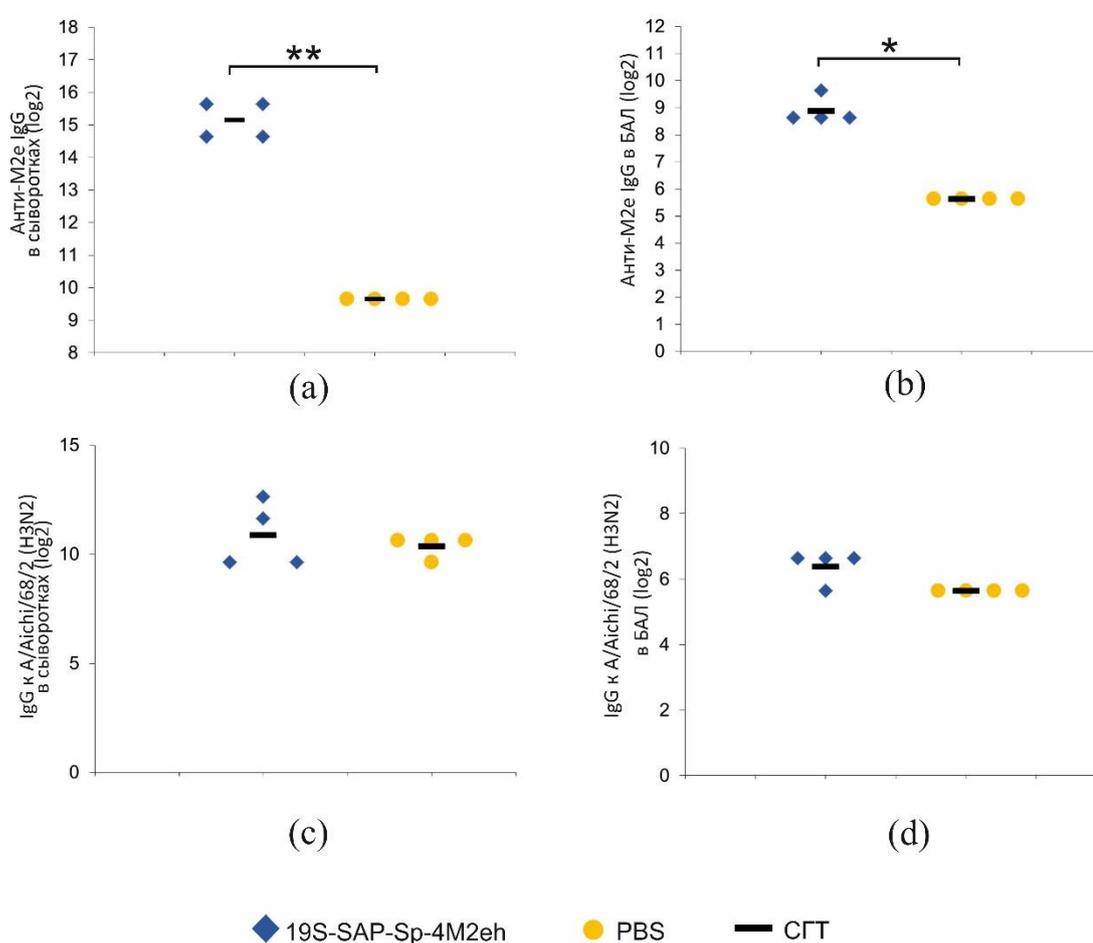


Рисунок 45. Титры антител в сыворотках и в БАЛ после третьей иммунизации мышей препаратом 19S-SAP-Sp-4M2eh растительного происхождения. (a) титры анти-M2e IgG в сыворотках крови; (b) титры анти-M2e IgG в БАЛ; (c) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в сыворотках крови; (d) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в БАЛ. Данные представлены в виде средних геометрических титров (СГТ) и значений, наблюдаемых у отдельных мышей. Указаны статистически значимые различия между экспериментальными группами (* - $0.01 < p < 0.05$, ** - $0.0001 < p < 0.001$).

Чтобы оценить защитное действие белка 19S-SAP-Sp-4M2eh, иммунизированных и контрольных мышей заражали вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4xLD50 (Рис. 46(b)). В опытной группе выжили 80% иммунизированных мышей, в то время как показатель выживаемости среди контрольной группы составил 40%.

В ходе заражения также следили за динамикой массы тела (Рис. 46(a)). Максимальная потеря веса у иммунизированной группы составила 9%, в то время как выжившие мыши в контрольной группе потеряли до 17% веса и восстанавливались медленнее.

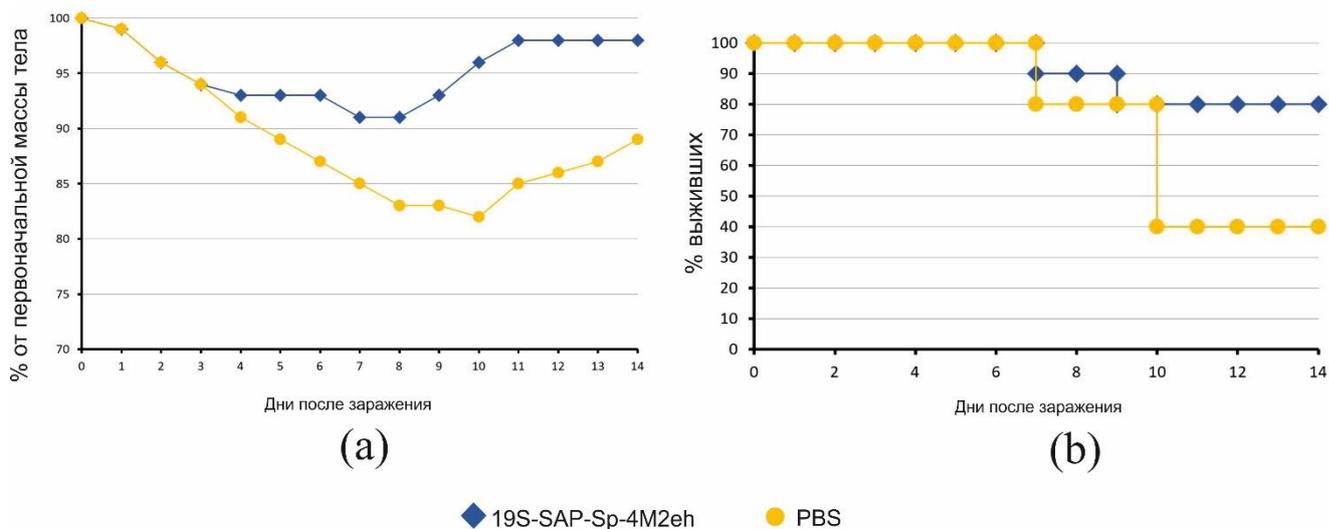


Рисунок 46. Изменение массы тела (a) и выживаемость (b) иммунизированных и контрольных мышей (PBS) в течение 14 дней после заражения 4xLD50 вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

ОБСУЖДЕНИЕ

1. Наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP

В связи с высокой изменчивостью вирусов гриппа, ежегодно требуется обновление состава вакцин, при этом сезонные вакцины должны включать антигены нескольких циркулирующих штаммов. Производство вакцин основано на прогнозировании того, какие преобладающие циркулирующие штаммы будут в данном сезоне. Однако прогнозы не всегда совпадают с реальными данными, особенно в случае появления новых пандемических штаммов. По этим причинам актуальной задачей является создание универсальной вакцины против гриппа. Такая вакцина должна обеспечивать перекрестную защиту между различными штаммами и обладать высокой иммуногенностью. Производство такой вакцины должно быть крупномасштабным. Вакцина, сочетающая в себе все эти характеристики, потенциально могла бы стать универсальной вакциной против гриппа, а не только вакциной против сезонного гриппа. Для достижения этих целей нами был использован подход, основанный на использовании самособирающихся наночастиц в качестве носителей консервативных антигенов вируса гриппа.

Coiled-Coil домены олигомеризации используются для получения белковых наночастиц, на основе которых можно создавать нановакцины. Эти домены состоят из двух или более спиралей, обернутых друг вокруг друга. Для презентации антигена можно использовать альфа-спиральные последовательности, которые при Coiled-Coil взаимодействии будут образовывать пептидные частицы, несущие на поверхности целевой антиген. В работе были получены наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP.

Образование суперспиралей и их стабильность являются необходимым условием для самосборки пептидов SAP в наночастицы. Гидрофобные взаимодействия в спиральных структурах Coiled Coil доменов являются основной движущей силой для образования суперспиралей. Другими факторами стабильности суперспиралей являются меж- и внутриспиральные солевые мостики (Meier and Burkhard, 2006). Удаление единственного межспирального солевого мостика может даже нарушить образование Coiled Coil мотивов (Meier *et al.*, 2002). Поэтому так важно сохранить определенную геометрию между тримерными и пентамерными спиральными доменами в SAP. Конформация и угол между двумя доменами SAP строится за счет двух остатков глицина, расположенных между ними, а также зависит от взаимодействия с другими мономерами SAP при образовании частиц, в которых участвуют гидрофобные, электростатические, водородные связи. На эти нековалентные взаимодействия влияют буферные условия, такие как pH, концентрация NaCl, различные соразтворители, например, глицерин. Таким образом, важно подобрать условия рефолдинга для

самособирающихся частиц, так как это будет влиять на их размер, форму и агрегационные свойства.

Используемый нами мономерный пептид SAP состоит из двух спиральных доменов. N-конец представляет собой пентамерный спиральный домен, С-конец – тримерный спиральный домен. Эти два домена олигомеризации соединены линкером, состоящим из двух остатков глицина, и содержат два остатка цистеина, которые могут образовывать либо внутримолекулярные дисульфидные связи, придающие определённое значение угла между спиральями, либо межмолекулярные дисульфидные связи, что может приводить к агрегации (Raman *et al.*, 2006). На С-конце SAP мы дополнительно поместили спиральный линкер Sp для разделения SAP и целевых антигенных пептидов. Такое разделение увеличивает расстояние между эпитопом и образованным SAP «ядром» наночастицы и тем самым улучшает сборку и повышает доступность эпитопов для иммунной системы.

Были сконструированы химерные гены и получены в клетках *E. coli* рекомбинантные белки 19S-SAP и 19S-SAP-Sp, включающие N-концевую гексагистидиновую метку для очистки белка методом никелевой - аффинной хроматографии. Гексагистидиновая последовательность была отделена от остальной части белка гибким глицин-сериновым линкером длиной 19 а.о. (19S), чтобы улучшить ее взаимодействие с Ni-сорбентом. Рекомбинантные белки были очищены в денатурирующих условиях. Белок his-19s-SAP при диализе со ступенчатым понижением концентрации мочевины агрегирует и выпадает в осадок. Ступенчатый рефолдинг при более низкой концентрации препарата (0,1 мг/мл) и последующее его концентрирование также не позволили предотвратить агрегацию белка. Однако, включение спирального линкера Sp на С-конец способствовало формированию стабильных наночастиц размером 15-25 нм после диализа со ступенчатым понижением концентрации мочевины при концентрации белка 0,5-0,8 мг/мл.

Механизм ренатурации белка имеет решающее значение для получения однородных стабильных частиц. Решающую роль здесь может играть образование меж- и внутриспиральных дисульфидных связей. Олигомеризационные свойства пептида SAP обусловлены двумя различными олигомеризационными доменами, соединенными линкерным сегментом из двух остатков глицина в сочетании с образованием межмолекулярных дисульфидных мостиков между различными пептидными цепями. Высокая концентрация пептидов и/или диализ в нативных условиях может приводить к образованию сети пептидов, которые сшиваются либо путем олигомеризации доменов Coiled-Coil, либо с помощью межмолекулярных дисульфидных мостиков с образованием нерегулярных агрегатов (Raman *et al.*, 2006). Известно, что пентамерные и тримерные спиральные домены, используемые в SAP, образуют стабильные олигомеры, которые формируются при умеренно высокой концентрации

мочевины (Guo *et al.*, 2000, Burkhard *et al.*, 2002). При образовании этих Coiled Coil доменов происходит контакт двух цистеинов одной пептидной молекулы и их экранирование, следовательно, они становятся недоступными для межмолекулярных контактов. Рефолдинг со ступенчатым понижением концентрации мочевины приводил к быстрому образованию внутримолекулярных дисульфидных мостиков и при этом позволил избежать образования хаотичных межмолекулярных дисульфидных связей.

Геометрические ограничения, действующие на два домена олигомеризации SAP, при образовании тримеров и пентамеров приводят к самосборке наночастиц и определяют их форму (Raman *et al.*, 2006). В оригинальном дизайне Raman *et al.*, 2006, частицы SAP имеют икосаэдрическую симметрию T=1, диаметр 16-20 нм и состоят из 60 пептидов, либо T=3, диаметр до 25 нм и состоят из 180 мономеров. Введение спирального линкера на С-конец, по-видимому, повлияло на геометрию SAP и изменило их угловую ориентацию и, как следствие, помогло формированию стабильных наночастиц.

Продукция 19S-SAP-Sp в бактериальной системе позволяет быстро получить большое количество потенциального препарата. Стабильность полученных частиц 19S-SAP-Sp позволяет длительно их хранить, что тоже является преимуществом. Эти частицы могут быть использованы в качестве носителей целевых антигенов и представления их в большом числе копий, что является критическим фактором для индукции сильного иммунного ответа.

2. Наночастицы на основе SAP, несущие консервативные эпитопы вируса гриппа

Защита от широкого спектра штаммов вируса гриппа А может быть достигнута за счет индукции защитных антител против консервативных последовательностей антигенов, таких как M2e и второй субъединицы гемагглютинина (HA2), которая образует «стебель» молекулы белка. Ранее было показано, что антитела против этих пептидных антигенов могут защищать от гриппозной инфекции (Fiers *et al.*, 2009, Ekiert *et al.*, 2011, Khanna *et al.*, 2014). Однако, недостатком использования консервативных эпитопов является их слабая иммуногенность. Чтобы преодолеть это, эпитопы были генетически слиты с самособирающимся пептидом SAP для их презентации на поверхности наночастиц.

В результате работы в *E. coli* были получены рекомбинантные белки, содержащие 4 копии консенсусной последовательности M2e пептида вирусов гриппа А человека и HA2 фрагмента гемагглютинина вируса гриппа А/Н3N2 (а.о. 76-130) слитых с SAP на С-конце. Также были получены аналогичные рекомбинантные белки без SAP пептида, которые представляли собой пептидные полиэпитопы и были использованы в качестве контроля.

Последовательности HA2 и M2e были размещены на С-конце домена тримерной олигомеризации SAP после Sp линкера. Количество копий этих пептидов было увеличено: HA2

был представлен двумя копиями, а M2e - четырьмя. Исследования показали, что увеличение числа копий M2e усиливает иммунный ответ (Ravin *et al.*, 2015). Такой же подход мы использовали в этом случае.

Очистка белков проводилась в денатурирующих условиях с последующим ступенчатым рефолдингом, чтобы избежать хаотического образования межмолекулярных дисульфидных мостиков. С помощью этого метода белки самособирались *in vitro* в сферические наночастицы размером 20-50 нм. Размер этих частиц был больше, чем частиц без антигенов вируса гриппа (19S-SAP-Sp). По-видимому, присоединение антигенных пептидов к SAP-Sp приводило к увеличению размера частиц, которые оказались более разнородными. Также по данным микроскопии наблюдалось образование агрегатов белков. Это можно связать с простой агрегацией наночастиц (т.е. слипание двух, трех или более частиц) и/или с тем, что размер увеличен из-за изменения геометрии и стехиометрии наночастиц (например, образование удлиненных/несферических структур, а не обладание строгой икосаэдрической симметрией). Последовательность HA2 имеет много гидрофобных аминокислотных остатков, что также могло отрицательно повлиять на геометрию и стехиометрию SAP пептида. Тем не менее, полученные наночастицы представляют набор пептидных антигенов, что, как известно, является оптимальным для активного иммунного ответа (Bachmann *et al.*, 1993). На расположение эпитопов M2e на поверхности частиц указывает их доступность для M2e-специфических антител. Более того, в наночастицах, содержащих антигены вируса гриппа на N- и C-концах SAP пептида, расположенные на поверхности антигены эффективно экранировали «ядро» частицы, препятствуя их распознаванию антителами против SAP.

Для характеристики иммунного ответа рекомбинантные белки вводили мышам интраназально без использования адъювантов. Белки на основе SAP проявляли одинаковую иммуногенность в отношении M2e независимо от присутствия пептида HA2. Аналогичные белки без SAP не образовывали наночастиц и вызывали гораздо более слабый иммунный ответ. Предыдущие исследования показали, что антитела, специфичные к M2e, не могут непосредственно нейтрализовать вирус гриппа, но могут обеспечивать перекрестную защиту, индуцируя несколько механизмов иммунных реакций, опосредуемых антителами и клетками. Наиболее хорошо охарактеризованными защитными механизмами являются ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность), ADCP (антителозависимый клеточный фагоцитоз) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность) (Huber *et al.*, 2001). Таким образом, антитела к M2e являются важным фактором защиты от вирусов гриппа.

Антитела, взаимодействующие с препаратом цельного вируса, были обнаружены только у мышей, иммунизированных белком 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, но не 19s-SAP-Sp-4M2eh. Этот результат можно объяснить тем, что в отличие от гемагглютинина, M2 является минорным

компонентом вириона (Zebedee and Lamb, 1988), поэтому М2е-специфичные антитела плохо связываются с вирусом. Слабый иммунный ответ на вирус в случае белка 19s-Sp-2HA2-4M2eh, вероятно, обусловлен неспособностью этого белка образовывать высокоиммуногенные наночастицы.

Интраназальный способ введения препаратов имеет значительные преимущества для вакцинации. Многие исследования показали, что такие интраназальные вакцины индуцируют сывороточные IgG и мукозальные IgA, которые играют важную роль в эффективности вакцины (Stepanova *et al.*, 2015, Qi *et al.*, 2018). Интраназальная вакцинация рекомбинантными белками 19s-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh приводила к образованию не только высоких титров IgG в сыворотках и в БАЛ, а также IgA в БАЛ.

Мы проанализировали Т-клеточный ответ после иммунизации мышей белком 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, поскольку он образовывал высокоиммуногенные наночастицы и содержит как М2е, так и HA2. Было выявлено, что эти наночастицы индуцировали образование клеток CD4+Т-клеток памяти (Тem), специфичных к М2е пептиду. В селезенке М2е-специфичные CD4+ Тem-клетки были одиночными (IFN- γ +) и двойными продуцентами цитокинов (IL-2+/TNF- α +) . В легких иммунизированных мышей доминирующей популяцией были CD4+ Тem-клетки, продуцирующие IL-2+/TNF- α +. В поддержании иммунной памяти мультицитокин-продуцирующие антиген-специфические CD4+ Т-клетки, являются более важными, чем продуценты одного цитокина, и их количество коррелирует с защитным противовирусным иммунитетом (Harari *et al.*, 2006, Kannangana *et al.*, 2007). В целом, эти результаты предполагают, что интраназальная иммунизация мышей 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh индуцирует генерацию М2е-специфичных CD4+ Тem-клеток, которые продуцируют один или два цитокина. Вакцины на основе пептида М2е вызывают в основном гуморальный, а не Т-клеточный иммунный ответ (Jegerlehner *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2015). В то же время специфичный для М2е ответ CD4+ Т-клеток важен для широкой защиты от инфекций гриппа (Swain *et al.*, 2012). Также наблюдалось образование вирус-специфичных CD8+ Т-клеток, но различия с контрольной группой не были статистически значимыми.

В результате рекомбинантные белки, самособирающиеся в наночастицы, смогли защитить животных от смертельного заражения вирусом гриппа А. Оба белка, 19s-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, обеспечивали 90%-100% защиту от штамма вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) из первой филогенетической группы и штамма вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) из второй филогенетической группы. Напротив, в случае 19S-Sp-4M2eh наблюдалась только 40% защита от вируса А/PR/8/34 (H1N1), что еще раз подтверждает важность образования наночастиц для эффективного иммунного ответа. В случае заражения штаммом А/Aichi/2/68 (H3N2) даже не образующий наночастицы белок 19S-Sp-4M2eh обеспечивал 90%

защиту. Мы предполагаем, что доза инфекции в этом случае была ниже ожидаемой, поскольку 30% выживаемость наблюдалась даже в контрольной группе (PBS).

Защитный эффект рекомбинантных белков с SAP пептидом (19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-SAP-Sp-4M2eh) подтверждается и статистически значимым снижением титров вируса в легких иммунизированных мышей по сравнению с контрольными мышами после заражения штаммом A/PR/8/34 (H1N1) или A/Aichi/2/68 (H3N2).

Задачей создания новых противогриппозных вакцин является расширение спектра индуцируемого иммунитета за счет включения в них нескольких эпитопов с различным механизмом индукции иммунитета, не только гуморального, но и Т-клеточного. Белок 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh усложнили, добавив на N-конец пентамерного домена SAP консервативные последовательности из нуклеопротеинового белка (255-275 а.о. и 335-350 а.о.) и универсальный Т-клеточный эпитоп PADRE. В итоге, были получены частицы, которые несут разные типы консервативных антигенов/эпитопов вируса гриппа и представляют собой повторяющиеся антигенные дисплеи. Такое сочетание делает их способными индуцировать не только гуморальный иммунный ответ, но и Т-клеточный.

Очистка белков проводилась в денатурирующих условиях с последующим ступенчатым рефолдингом, как и в предыдущих экспериментах. Белки с SAP пептидом самособирались в сферические наночастицы размером 15-35 нм. Доступность M2e пептида для антител и экранирование SAP эпитопами была показана с помощью ИФА.

После иммунизации мышей препаратами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh (контроль без SAP пептида) мы не наблюдали различий в титрах анти-M2e IgG в сыворотке крови между группами мышей, иммунизированных рекомбинантными белками с пептидом SAP и без него. Контрольный белок, который не содержит пептида SAP, содержал четыре тандемные копии M2e. Вероятно, иммуногенность пептида M2e увеличилась за счет того, что он был включен в длинный полипептид. Такие линейные полиэпитопные белки могут эффективно индуцировать иммунный ответ (Romeli *et al.*, 2020), даже без образования наночастиц. Напротив, титры IgG к вирусу A/Aichi/2/68 (H3N2) были значительно выше в сыворотках мышей, иммунизированных белком, несущим SAP, чем в группе мышей, иммунизированных аналогичным белком без SAP. Слабый иммунный ответ на вирус в случае 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh, вероятно, обусловлен его неспособностью образовывать наночастицы. Иммунный ответ на весь вирус гриппа отражает преимущественно выработку антител к пептиду HA2 из стволовой области HA. Активность таких антител может приводить к нейтрализации вирусов гриппа, хотя их нейтрализующая активность слабее, чем у антител к головному домену гемагглютинина, которые непосредственно препятствуют связыванию с клеточным рецептором. Антитела к

стволовой области НА также обеспечивают множество косвенных механизмов защиты, включая антителозависимые эффекторный механизмы (Jegaskanda *et al.*, 2017) и ингибирование ферментативной активности нейраминидазы (Wohlbold *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2019). Следовательно, важно включать консервативные фрагменты гемагглютинина в вакцины-кандидаты для формирования более широкого иммунного ответа, чем в случае только M2e.

В настоящее время основными средствами борьбы с гриппом являются традиционные инактивированные и живые аттенуированные вакцины, которые индуцируют вируснейтрализующие антитела, нацеленные на гемагглютинин. Однако они специально не нацелены на Т-клеточный иммунный ответ, несмотря на доказательства того, что он играет значительную защитную роль при инфекции (Bender *et al.*, 2003). Более того, большинство Т-клеточных эпитопов обнаружено во внутренних белках вируса гриппа. В нашей работе мы использовали эпитопы CD8⁺ Т-клеток из нуклеопротеина, а также универсальный эпитоп CD4⁺ Т-клеток PADRE для генерации широкого Т-клеточного ответа.

Индукция сильного долгосрочного CD4⁺/CD8⁺ Т-клеточного иммунитета является важным инструментом эффективной защиты (Doherty *et al.*, 1997). Ни CD8⁺ клетки, ни CD4⁺ клетки, ни В-клетки сами по себе не могут обеспечить эффективный вирусный клиренс (Gerhard, 2001). Следовательно, иммунный ответ на вирус гриппа требует сложного взаимодействия между цитотоксическими Т-клетками, В-клетками, продуцирующими антитела, и Т-лимфоцитами-хелперами. Мышиные модели пневмонии гриппа А представляют собой хорошо зарекомендовавшую себя экспериментальную систему для изучения иммунитета, опосредованного Т-клетками. В частности, Т-клеточный иммунный ответ на гриппозную инфекцию был хорошо охарактеризован у мышей C57BL/6 (B6, H2b) (Thomas *et al.*, 2006). Именно на этой линии мышей мы изучали формирование Т-клеточного ответа после иммунизации наночастицами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh.

Наблюдалось образование CD4⁺ Тем-клеток в селезенке, которые продуцировали IL-2 при стимуляции M2e, а также образование M2e-специфичных CD8⁺ Тем-клеток, продуцирующих два типа цитокинов, TNF- α и IL-2. Было также обнаружено, что иммунизация вызывала образование вирус-специфичных CD8⁺ продуцентов IFN- γ . CD8⁺ Т-клетки, в дополнение к своей цитотоксической функции, могут секретировать хемокины, которые способны привлекать другие иммунные клетки. Выработка цитокинов CD8⁺ Т-клетками, таких как IFN- γ , TNF- α , дополнительно усиливает их цитотоксичность и модулирует врожденную и адаптивную иммунные системы, направляя иммунные ответы по пути Th1 (Chalifour *et al.*, 2004). В целом, наночастицы, несущие консервативные антигены вируса гриппа и эпитоп PADRE, индуцировали образование антигенспецифичных многофункциональных CD4⁺/CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти.

Изучение Т-клеточного ответа показало появление вирус-специфичных полифункциональных CD8⁺ Т-клеток памяти, экспрессирующих CD107a и IFN- γ , в селезенке иммунизированных мышей. CD107a относится к семейству LAMP и представляет собой высокогликозилированные мембранные белки литических гранул, содержащие гранзим и перфорин (Kannan *et al.*, 1996). Было описано, что экспрессия CD107a сильно повышается на поверхности CD8⁺ Т-клеток при активации цитотоксической функции этих клеток путем высвобождения содержимого таких гранул. Можно предположить, что CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CD107a и IFN- γ , проявляют цитотоксическую функцию по отношению к клеткам, зараженным вирусом гриппа.

По сравнению с данными, полученными в результате иммунизации препаратом 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eH, включение эпитопов PADRE и NP в эти наночастицы расширило спектр Т-клеточного иммунного ответа. Например, иммунизация мышей наночастицами 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eH не индуцировала образование M2e-специфичных CD8⁺ Tem и вирус-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Tem клеток на уровне, значительно отличающемся от контроля PBS. А иммунизация мышей наночастицами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eH вызвала образование как M2e-специфичных CD8⁺ Tem-клеток, продуцирующих IL-2 и TNF- α , так и генерацию вирус-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Tem-клеток, продуцирующих IFN- γ . Поскольку Т-клеточный иммунитет важен для широкой защиты от гриппозных инфекций, расширение спектра Т-клеточного ответа должно повысить эффективность вакцины-кандидата (Clemens *et al.*, 2018, Sridhar *et al.*, 2016).

Хотя иммунизация наночастицами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eH индуцировала образование M2e-специфичных и вирус-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Tem-клеток, образование NP-специфичных Tem-клеток не наблюдалось. Возможно, что это было вызвано расположением NP-эпитопов на наночастице, которое не было оптимальным для генерации иммунного ответа, поскольку, в отличие от HA2 и M2e, NP-эпитопы были прикреплены к N-концу пептида SAP. Возможным решением этой проблемы было бы использование смеси из трех типов частиц SAP, несущих только один из антигенов (NP-эпитопы, HA2 и M2e). Альтернативой могло бы быть получение мозаичных наночастиц путем самосборки трех рекомбинантных белков на основе SAP *in vitro*. Такая концепция была использована в работах с наночастицами на основе SAP, несущими последовательность флагеллина (Karch *et al.*, 2017, Kaba *et al.*, 2018).

Традиционные инактивированные и живые аттенуированные вакцины направлены на нейтрализацию вируса гриппа и, таким образом, предотвращение инфекции, в то время как рекомбинантные вакцины на основе консервированных вирусных антигенов способствуют разрушению инфицированных клеток и ускоренной элиминации вируса: они направлены на

сокращение продолжительности заболевания и предотвращение тяжелых форм. Полученные рекомбинантные белки, которые самособираются в наночастицы, смогли обеспечить защиту от смертельной дозы вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (2 филогенетическая группа). Мыши, иммунизированные этим препаратом, показали 90% выживаемость после заражения. У мышей наблюдалась небольшая потеря массы тела, и они начали выздоравливать на седьмой день после заражения. Напротив, в случае белка без пептида SAP (19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh) наблюдалась менее эффективная защита и большая потеря массы тела, что привело к длительному восстановлению. Эти данные еще раз подтверждают важность образования наночастиц для эффективного развития иммунного ответа против консервативных антигенов вируса гриппа.

Полученные рекомбинантные наночастицы на основе самособирающегося пептида, несущие консервативные антигены вируса гриппа, могут быть использованы для разработки универсальной кандидатной вакцины против гриппа, которую можно было бы использовать как самостоятельную или, возможно, в качестве дополнительного компонента к существующим трехвалентным вакцинам для расширения их защитных свойств.

3. Получение в растениях-продуцентах наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих эпитопы вируса гриппа

В первой части работы мы использовали SAP в качестве носителя для презентации эпитопов вируса гриппа на поверхности самособирающихся наночастиц и получали такие рекомбинантные белки в бактериальной системе экспрессии. Простые и удобные при массовом производстве экспрессионные системы необходимы для наработки рекомбинантных белков, служащих в качестве вакцин. Для получения рекомбинантных белков можно использовать растительные системы экспрессии, которые обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими системами. Например, они предполагают более низкие производственные затраты, чем использование биореакторов или культур клеток; возможность масштабируемости процессов; безопасность - растения не содержат известных патогенов человека, которые могли бы загрязнить конечный продукт (Horn *et al.*, 2004).

Транзиентная экспрессия генов является удобным способом продукции рекомбинантных белков в растениях. Этот способ обладает преимуществом в скорости перед методом создания стабильных трансгенных линий, который требует много времени и сил (Rybicki *et al.*, 2014). Методом агроинфильтрации можно вводить плазмидный вектор с помощью штаммов *Agrobacterium tumefaciens* в отдельные листья или в целые растения. Такой способ позволяет быстро и легко масштабировать процесс, а также упрощает создание кассет для экспрессии генов (Lomonossoff *et al.*, 2016).

Целью этой части работы было получение в растениях наночастиц на основе SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа А. Для экспрессии рекомбинантных белков в растениях *N. bethamiana*, мы использовали самореплицирующийся вирусный вектор pEff (Mardanova *et al.*, 2017), который использовался для получения различных рекомбинантных белков (Mardanova *et al.*, 2022, Блохина и др., 2018, Saunders *et al.*, 2022, Zahmanova *et al.*, 2019).

На первом этапе была показана возможность экспрессии в растениях и очистки рекомбинантного белка с SAP пептидом. Белок 19S-SAP-Sp экспрессировался на уровне около 100 мкг/г биомассы свежих листьев, а итоговый выход после очистки составлял около 40 мкг/г. Однако выход 19S-SAP-Sp был примерно в 10-15 раз ниже максимально достигнутого для системы экспрессии pEff (Mardanova *et al.*, 2017). Некроз растительной ткани после агроинfiltrации белком 19S-SAP-Sp был замечен уже на 3-4 день, что вероятно, ограничивало уровень экспрессии. Очистка целевого белка в денатурирующих условиях с использованием металл-аффинной хроматографии и последующего поэтапного диализа привела к самосборке белка *in vitro* в сферические наночастицы размером около 15-25 нм.

Далее была предпринята попытка получить рекомбинантные белки с SAP пептидом и антигенами вируса гриппа. Однако только белок 19S-SAP-Sp-4M2eh удалось экспрессировать на уровне, достаточном для дальнейшего изучения и использования в качестве кандидатного вакцинного препарата. Белок 19S-SAP-Sp-4M2eh синтезировался на уровне около 80-100 мкг/г биомассы свежих листьев, а выход очистки составлял около 60 мкг/г, тогда как для белков 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh уровень экспрессии был ниже 20 мкг/г ткани листа. Некоторые фьюжн-белки с M2e экспрессировались в растениях, использующих систему pEff, на более высоких уровнях, например, до 1 мг/г для фьюжн-белка флагеллина с M2e и 300-400 мкг/г для M2e, слитого с белком капсида гепатита Е (Mardanova *et al.*, 2015, Mardanova *et al.*, 2022). Тем не менее, уровень экспрессии 19S-SAP-Sp-4M2eh в растениях был в несколько раз выше, чем достигнутый при использовании аналогичной системы экспрессии для получения M2e-несущих частиц на основе корового антигена вируса гепатита В (Ravin *et al.*, 2012). Сочетание SAP пептида с гидрофобными последовательностями HA2, NP, PADRE приводило к снижению экспрессии. Сильный некроз растительной ткани наблюдался уже на второй день после infiltration в случае белков 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh.

Очистка белка 19S-SAP-Sp-4M2eh из растений-продуцентов в денатурирующих условиях с использованием металл-аффинной хроматографии и последующего диализа с понижением концентрации мочевины привела к самосборке белка *in vitro* в сферические наночастицы размером около 15-30 нм. Морфологически частицы 19S-SAP-Sp и частицы с M2e пептидом были схожи.

Иммунизация мышей наночастицами 19S-SAP-Sp-4M2eh индуцировала высокие уровни антител против M2e как в сыворотках крови, так и в БАЛ, при этом титры вирус-специфических IgG не различались между опытной группой и контролем. Это можно объяснить тем, что антитела на вирус гриппа в основном представлены HA-специфичными антителами, а в составе рекомбинантного белка последовательности гемагглютинина отсутствовали. Для белка 19S-SAP-Sp-4M2eh, полученного в бактериальной системе экспрессии, наблюдалась аналогичная картина.

Иммунизация мышей «растительными» наночастицами 19S-SAP-Sp-4M2eh обеспечивала 80% защиту от заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Аналогичные показатели выживаемости (90%) были зарегистрированы у мышей, которые были иммунизированы продуцируемым в *E. coli* препаратом 19s-SAP-Sp-4M2eh, после заражения вирусами A/PR/8/34 (H1N1) или A/Aichi/2/68 (H3N2). Таким образом, наночастицы на основе SAP, содержащие M2e, полученные в бактериальной и растительной системах экспрессии, обладают сходными иммуногенными характеристиками и показали свою иммуногенность и протективность.

Рекомбинантные белки на основе SAP могут быть модифицированы и усложнены под необходимые задачи. Это прокладывает путь к вакцинам против гриппа следующего поколения, характеризующихся быстрой разработкой, высокой иммуногенностью, возможностью широкой перекрестной защиты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате работы был получен новый тип наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP со спиральным линкером Sp, присоединенным к С-концу SAP. Эти частицы могут быть носителями целевых антигенов, представляющими на своей поверхности большое число копий антигена, что является важным фактором для индукции эффективного иммунного ответа.

Наночастицы на основе SAP были использованы в качестве носителей антигенов вируса гриппа А. В бактериях *E. coli* были экспрессированы три типа рекомбинантных белков на основе SAP, дополнительно содержащих: (1) только M2e пептид, (2) M2e пептид и фрагмент второй субъединицы гемагглютинина (HA2) и (3) M2e пептид, HA2, эпитопы нуклеопротеина и универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE. Полученные рекомбинантные белки после рефолдинга *in vitro* образовывали наноразмерные частицы. Иммунизация мышей наночастицами с M2e пептидом индуцирует гуморальный иммунный ответ против M2e и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции. Более широкий спектр иммунного ответа наблюдался в случае частиц, несущих M2e и HA2. Иммунизация мышей этим препаратом индуцировала высокий уровень M2e- и вирус-специфических антител, образование M2e-специфических многофункциональных CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти и обеспечивала защиту мышей от заражения летальной дозой вируса гриппа А различных субтипов. Аналогичные результаты были получены для наночастиц, представляющих M2e, HA2, эпитопы нуклеопротеина и Т-хелперный эпитоп PADRE. В этом случае индуцировался гуморальный иммунный ответ против M2e и целого вируса гриппа, образовывались антиген-специфичные CD4⁺ и CD8⁺ эффекторные Т-клетки памяти, секретирующие цитокины. Образование наночастиц рекомбинантными белками играло ключевую роль в их эффективности, поскольку наночастицы на основе SAP, несущие антигены вируса гриппа, обладали более высокой иммуногенностью и обеспечивали лучшую защиту иммунизированных мышей от летальной гриппозной инфекции по сравнению с аналогичными белками без SAP пептида, которые не образуют наночастицы.

Наряду с бактериальной системой экспрессии для получения наночастиц-носителей антигенов вируса гриппа был использован метод транзientной экспрессии в растениях *N. bethamiana* с помощью фитовирусных векторов. Полученный в растениях рекомбинантный белок на основе SAP, несущий M2e, после рефолдинга *in vitro* образовывал наноразмерные частицы. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцировала высокие уровни M2e-специфических антител и обеспечивала защиту от летальной гриппозной инфекции.

Таким образом, полученные наночастицы на основе SAP пептида, несущие консервативные антигены вируса гриппа А, могут быть использованы для разработки новых рекомбинантных вакцин против гриппа, характеризующихся быстрой получением, высокой иммуногенностью, возможностью защиты от широкого спектра штаммов вируса гриппа.

Более того, разработанные методы создания наночастиц-носителей целевых антигенов могут быть использованы для создания рекомбинантных вакцин против других актуальных патогенов человека и животных.

ВЫВОДЫ

1. Сконструированы химерные гены и получены в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе самособирающегося пептида SAP, содержащие консервативные антигены вируса гриппа А: М2е пептид, фрагмент второй субъединицы гемагглютинина (НА2) и эпитопы нуклеопротеина.

2. Полученные в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе самособирающегося пептида SAP после рефолдинга белка *in vitro* образуют наноразмерные частицы.

3. Наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP, несущие антигены вируса гриппа, обладают более высокой иммуногенностью и обеспечивают лучшую защиту иммунизированных мышей от летальной гриппозной инфекции по сравнению с аналогичными белками без SAP пептида, которые не образуют наночастицы.

4. Иммунизация мышей наночастицами, несущими пептиды М2е и НА2, индуцировала гуморальный иммунный ответ против М2е и целого вируса гриппа, а также образование антиген-специфичных многофункциональных CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти, секретирующих цитокины.

5. Синтезированный в растениях рекомбинантный белок на основе самособирающегося пептида SAP, несущего М2е пептид, после рефолдинга *in vitro* образует наноразмерные частицы. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцирует гуморальный ответ против М2е и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. **Zykova A.A.**, Blokhina E.A., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Tsybalova L.M., Kuprianov V.V., Ravin N.V. (2022) Nanoparticles Based on Artificial Self-Assembling Peptide and Displaying M2e Peptide and Stalk HA Epitopes of Influenza A Virus Induce Potent Humoral and T-Cell Responses and Protect against the Viral Infection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 39: 102463. ИФ₂₀₂₃ WoS 4,2. Доля участия 70%. 0.9 п. л.
2. **Zykova A.A.**, Blokhina E.A., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Ozhereleva O.O., Tsybalova L.M., Kuprianov V.V., Ravin N.V. (2023) Nanoparticles Carrying Conserved Regions of Influenza A Hemagglutinin, Nucleoprotein, and M2 Protein Elicit a Strong Humoral and T Cell Immune Response and Protect Animals from Infection. *Molecules*. 28: 6441. ИФ₂₀₂₃ WoS 4,2. Доля участия 60%. 1 п. л
3. Blokhina E.A., Mardanova E.S., **Zykova A.A.**, Stepanova L.A., Shuklina M.A., Tsybalova L.M., Ravin N.V. (2023) Plant-Produced Nanoparticles Based on Artificial Self-Assembling Peptide Bearing the Influenza M2e Epitope. *Plants*. 12: 2228. ИФ₂₀₂₃ WoS 4,0. Доля участия 40%. 0.6 п. л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Petrushina I., Vasilevko V., Movsesyan N., Mkrtichyan M., Saing T., Cribbs D.H. Prototype Alzheimer's Disease Vaccine Using the Immunodominant B Cell Epitope from β -Amyloid and Promiscuous T Cell Epitope Pan HLA DR-Binding Peptide // *The Journal of Immunology*. 2005. V. 174. № 3. P. 1580-1586.
2. Alexander J., Del Guercio M.-F., Maewal A., Qiao L., Fikes J., Chesnut R.W., Paulson J., Bundle D.R., DeFrees S., Sette A. Linear PADRE T Helper Epitope and Carbohydrate B Cell Epitope Conjugates Induce Specific High Titer IgG Antibody Responses // *The Journal of Immunology*. 2000. V. 164. № 3. P. 1625-1633.
3. Alexander J., Sidney J., Southwood S., Ruppert J., Oseroff C., Maewal A., Snoke K., Serra H.M., Kubo R.T., Sette A., Grey H.M. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides // *Immunity*. 1994. V. 1. № 9. P. 751-761.
4. Ana-Sosa-Batiz F., Vanderven H., Jegaskanda S., Johnston A., Rockman S., Laurie K., Barr I., Reading P., Lichtfuss M., Kent S.J. Influenza-Specific Antibody-Dependent Phagocytosis // *PLOS ONE*. 2016. V. 11. № 4. P. e0154461.
5. Apostolovic B., Danial M., Klok H.-A. Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials // *Chemical Society Reviews*. 2010. V. 39. № 9. P. 3541.
6. Arai R., Ueda H., Kitayama A., Kamiya N., Nagamune T. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein // *Protein Engineering Design and Selection*. 2001. V. 14. № 8. P. 529-532.
7. Asha K., Kumar B. Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! // *Journal of Clinical Medicine*. 2019. V. 8. № 2. P. 192.
8. Atsmon J., Kate-Ilovitz E., Shaikevich D., Singer Y., Volokhov I., Haim K.Y., Ben-Yedidia T. Safety and Immunogenicity of Multimeric-001—a Novel Universal Influenza Vaccine // *Journal of Clinical Immunology*. 2012. V. 32. № 3. P. 595-603.
9. Babapoor S., Neef T., Mittelholzer C., Girshick T., Garmendia A., Shang H., Khan M.I., Burkhard P. A Novel Vaccine Using Nanoparticle Platform to Present Immunogenic M2e against Avian Influenza Infection // *Influenza Research and Treatment*. 2011. V. 2011. P. 1-12.
10. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns // *Nature Reviews Immunology*. 2010. V. 10. № 11. P. 787-796.
11. Bachmann M.F., Rohrer U.H., Kündig T.M., Bürki K., Hengartner H., Zinkernagel R.M. The Influence of Antigen Organization on B Cell Responsiveness // *Science*. 1993. V. 262. № 5138. P. 1448-1451.
12. Bender B.S., Croghan T., Zhang L., Small P.A. Transgenic mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted T cells have delayed viral clearance and increased mortality after influenza virus challenge. // *The Journal of experimental medicine*. 1992. V. 175. № 4. P. 1143-1145.
13. Bernasconi V., Bernocchi B., Ye L., Le M.Q., Omokanye A., Carpentier R., Schön K., Saelens X., Staeheli P., Betbeder D., Lycke N. Porous Nanoparticles With Self-Adjuvanting M2e-Fusion Protein and Recombinant Hemagglutinin Provide Strong and Broadly Protective Immunity Against Influenza Virus Infections // *Frontiers in Immunology*. 2018. V. 9. P. 2060.
14. Bessa J., Schmitz N., Hinton H.J., Schwarz K., Jegerlehner A., Bachmann M.F. Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design // *European Journal of Immunology*. 2008. V. 38. № 1. P. 114-126.

15. Romeli S., Hassan S., Yap W. Multi-Epitope Peptide-Based and Vaccinia-Based Universal Influenza Vaccine Candidates Subjected to Clinical Trials // *Malays J Med Sci.* 2020. V. 27. № 2. P. 10-20.
16. Blokhina E.A., Mardanov E.S., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Ravin N.V. Plant-Produced Recombinant Influenza A Virus Candidate Vaccine Based on Flagellin Linked to Conservative Fragments of M2 Protein and Hemagglutinin // *Plants.* 2020. V. 9. № 2. P. 162.
17. Bodewes R., Kreijtz J.H.C.M., Geelhoed-Mieras M.M., Van Amerongen G., Verburgh R.J., Van Trierum S.E., Kuiken T., Fouchier R.A.M., Osterhaus A.D.M.E., Rimmelzwaan G.F. Vaccination against Seasonal Influenza A/H3N2 Virus Reduces the Induction of Heterosubtypic Immunity against Influenza A/H5N1 Virus Infection in Ferrets // *Journal of Virology.* 2011. V. 85. № 6. P. 2695-2702.
18. Bolte H., Rosu M., Hagelauer E., García-Sastre A., Schwemmle M. Packaging of the Influenza Virus Genome Is Governed by a Plastic Network of RNA- and Nucleoprotein-Mediated Interactions // *J Virol.* 2019. V. 93. P. e01861-18.
19. Boyoglu-Barnum S., Ellis D., Gillespie R.A., Hutchinson G.B., Park Y.-J., Moin S.M., Acton O.J., Ravichandran R., Murphy M., Pettie D., Matheson N., Carter L., Creanga A., Watson M.J., Kephart S., Ataca S., Vaile J.R., Ueda G., Crank M.C., Stewart L., Lee K.K., Guttman M., Baker D., Mascola J.R., Veelsler D., Graham B.S., King N.P., Kanekiyo M. Quadrivalent influenza nanoparticle vaccines induce broad protection // *Nature.* 2021. V. 592. № 7855. P. 623-628.
20. Braciale T.J., Sun J., Kim T.S. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection // *Nature Reviews Immunology.* 2012. V. 12. № 4. P. 295-305.
21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry.* 1976. V. 72. № 1-2. P. 248-254.
22. Brodin J.D., Ambroggio X.I., Tang C., Parent K.N., Baker T.S., Tezcan F.A. Metal-directed, chemically tunable assembly of one-, two- and three-dimensional crystalline protein arrays // *Nature Chemistry.* 2012. V. 4. № 5. P. 375-382.
23. Bromley K., Channon E., Moutevelis D., Woolfson. Peptide and protein building blocks for synthetic biology: from programming biomolecules to Self-organized biomolecular systems // *ACS Chem. Biol.* 2008. V. 3. P. 38-50.
24. Brown L.E., Kelso A. Prospects for an influenza vaccine that induces cross-protective cytotoxic T lymphocytes // *Immunology & Cell Biology.* 2009. V. 87. № 4. P. 300-308.
25. Burkhard P., Ivaninskii S., Lustig A. Improving Coiled-Coil Stability by Optimizing Ionic Interactions // *Journal of Molecular Biology.* 2002. V. 318. P. 901-910.
26. Burkhard P., Stetefeld J., Strelkov S.V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif // *Trends in Cell Biology.* 2001. V. 11. № 2. P. 82-88.
27. Burrell C.J., Mackay P., Greenaway P.J., Hofschneider P.H., Murray K. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322 // *Nature.* 1979. V. 279. № 5708. P. 43-47.
28. Chalifour A., Jeannin P., Gauchat J.-F., Blaecke A., Malissard M., N'Guyen T., Thieblemont N., Delneste Y. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers α -defensin production // *Blood.* 2004. V. 104. № 6. P. 1778-1783.
29. Chauhan R.P., Gordon M.L. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates // *Virus Genes.* 2022. V. 58. № 4. P. 255-269.
30. Chen J., Pompano R.R., Santiago F.W., Maillat L., Sciammas R., Sun T., Han H., Topham D.J.,

- Chong A.S., Collier J.H. The use of self-adjuvanting nanofiber vaccines to elicit high-affinity B cell responses to peptide antigens without inflammation // *Biomaterials*. 2013. V. 34. № 34. P. 8776-8785.
31. Chen Y.-Q., Lan L.Y.-L., Huang M., Henry C., Wilson P.C. Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies Interfere with Influenza Virus Neuraminidase Activity by Steric Hindrance // *Journal of Virology*. 2019. V. 93. № 4. P. e01526-18.
 32. Clemens E., Van De Sandt C., Wong S., Wakim L., Valkenburg S. Harnessing the Power of T Cells: The Promising Hope for a Universal Influenza Vaccine // *Vaccines*. 2018. V. 6. № 2. P. 18.
 33. Corbett K.S., Moin S.M., Yassine H.M., Cagigi A., Kanekiyo M., Boyoglu-Barnum S., Myers S.I., Tsybovsky Y., Wheatley A.K., Schramm C.A., Gillespie R.A., Shi W., Wang L., Zhang Y., Andrews S.F., Joyce M.G., Crank M.C., Douek D.C., McDermott A.B., Mascola J.R., Graham B.S., Boyington J.C. Design of Nanoparticulate Group 2 Influenza Virus Hemagglutinin Stem Antigens That Activate Unmutated Ancestor B Cell Receptors of Broadly Neutralizing Antibody Lineages // *mBio*. 2019. V. 10. № 1. P. e02810-18.
 34. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Agatic G., Bianchi S., Giacchetto-Sasselli I., Calder L., Sallusto F., Collins P., Haire L.F., Temperton N., Langedijk J.P.M., Skehel J.J., Lanzavecchia A. A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 850-856.
 35. Cox M.M.J., Patriarca P.A., Treanor J. FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2008. V. 2. № 6. P. 211-219.
 36. Cros J.F., García-Sastre A., Palese P. An Unconventional NLS is Critical for the Nuclear Import of the Influenza A Virus Nucleoprotein and Ribonucleoprotein // *Traffic*. 2005. V. 6. № 3. P. 205-213.
 37. Cross K., Langley W., Russell R., Skehel J., Steinhauer D. Composition and Functions of the Influenza Fusion Peptide // *Protein & Peptide Letters*. 2009. V. 16. № 7. P. 766-778.
 38. Crowe S.R., Turner S.J., Miller S.C., Roberts A.D., Rappolo R.A., Doherty P.C., Ely K.H., Woodland D.L. Differential Antigen Presentation Regulates the Changing Patterns of CD8+ T Cell Immunodominance in Primary and Secondary Influenza Virus Infections // *The Journal of Experimental Medicine*. 2003. V. 198. № 3. P. 399-410.
 39. De Filette M., Fiers W., Martens W., Birkett A., Ramne A., Löwenadler B., Lycke N., Jou W.M., Saelens X. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine // *Vaccine*. 2006. V. 24. № 44-46. P. 6597-6601.
 40. De Filette M., Min Jou W., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., Resch S., Fiers W. Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs // *Virology*. 2005. V. 337. № 1. P. 149-161.
 41. Decroix N., Quan C.P., Pamonsinlapatham P., Bouvet J. -P. Mucosal Immunity Induced by Intramuscular Administration of Free Peptides In-Line with PADRE: IgA Antibodies to the ELDKWA Epitope of HIV gp41 // *Scandinavian Journal of Immunology*. 2002. V. 56. № 1. P. 59-65.
 42. Deng L., Mohan T., Chang T.Z., Gonzalez G.X., Wang Y., Kwon Y.-M., Kang S.-M., Compans R.W., Champion J.A., Wang B.-Z. Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses // *Nature Communications*. 2018. V. 9. № 1. P. 359.
 43. DiLillo D.J., Tan G.S., Palese P., Ravetch J.V. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo // *Nature Medicine*. 2014. V. 20. № 2. P. 143-151.

44. Doherty P.C., Topham D.J., Tripp R.A., Cardin R.D., Brooks J.W., Stevenson P.G. Effector CD4 + and CD8 + T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections // *Immunological Reviews*. 1997. V. 159. № 1. P. 105-117.
45. Doll T.A.P.F., Dey R., Burkhard P. Design and optimization of peptide nanoparticles // *Journal of Nanobiotechnology*. 2015. V. 13. № 1. P. 73.
46. Drexler K.E. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981. V. 78. № 9. P. 5275-5278.
47. Du Q.-S., Huang R.-B., Wang S.-Q., Chou K.-C. Designing Inhibitors of M2 Proton Channel against H1N1 Swine Influenza Virus // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. № 2. P. e9388.
48. Ekiert D.C., Bhabha G., Elsliger M.-A., Friesen R.H.E., Jongeneelen M., Throsby M., Goudsmit J., Wilson I.A. Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope // *Science*. 2009. V. 324. № 5924. P. 246-251.
49. Ekiert D.C., Friesen R.H.E., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J.W.M., Brandenburg B., Vogels R., Brakenhoff J.P.J., Kompier R., Koldijk M.H., Cornelissen L.A.H.M., Poon L.L.M., Peiris M., Koudstaal W., Wilson I.A., Goudsmit J. A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 843-850.
50. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A., Van Rooijen N., Verbeek S., Fiers W., Saelens X. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 2011. V. 186. № 2. P. 1022-1031.
51. El Bissati K., Zhou Y., Dasgupta D., Cobb D., Dubey J.P., Burkhard P., Lanar D.E., McLeod R. Effectiveness of a novel immunogenic nanoparticle platform for Toxoplasma peptide vaccine in HLA transgenic mice // *Vaccine*. 2014. V. 32. № 26. P. 3243-3248.
52. Epstein S.L. Universal Influenza Vaccines: Progress in Achieving Broad Cross-Protection In Vivo // *American Journal of Epidemiology*. 2018. V. 187. № 12. P. 2603-2614.
53. Fiers W., De Filette M., Bakkouri K.E., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccine // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 45. P. 6280-6283.
54. Fischer R., Buyel J.F. Molecular farming – The slope of enlightenment // *Biotechnology Advances*. 2020. V. 40. P. 107519.
55. Fletcher J.M., Harniman R.L., Barnes F.R.H., Boyle A.L., Collins A., Mantell J., Sharp T.H., Antognozzi M., Booth P.J., Linden N., Miles M.J., Sessions R.B., Verkade P., Woolfson D.N. Self-Assembling Cages from Coiled-Coil Peptide Modules // *Science*. 2013. V. 340. № 6132. P. 595-599.
56. Gao X., Wang W., Li Y., Zhang S., Duan Y., Xing L., Zhao Z., Zhang P., Li Z., Li R., Wang X., Yang P. Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge // *Antiviral Research*. 2013. V. 98. № 1. P. 4-11.
57. Gerhard W. The Role of the Antibody Response in Influenza Virus Infection // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2001. V. 260. P. 171-190.
58. Gerhard W., Mozdzanowska K., Zharikova D. Prospects for Universal Influenza Virus Vaccine // *Emerging Infectious Diseases*. 2006. V. 12. № 4. V. 569-574.
59. Ghaffari-Nazari H., Tavakkol-Afshari J., Jaafari M.R., Tahaghoghi-Hajghorbani S., Masoumi E., Jalali S.A. Improving Multi-Epitope Long Peptide Vaccine Potency by Using a Strategy that Enhances CD4+ T Help in BALB/c Mice // *PLOS ONE*. 2015. V. 10. № 11. P. e0142563.

60. Glover J.N.M., Harrison S.C. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos–Jun bound to DNA // *Nature*. 1995. V. 373. № 6511. P. 257-261.
61. Golebiewski L., Liu H., Javier R.T., Rice A.P. The Avian Influenza Virus NS1 ESEV PDZ Binding Motif Associates with Dlg1 and Scribble To Disrupt Cellular Tight Junctions // *Journal of Virology*. 2011. V. 85. № 20. P. 10639-10648.
62. Gonzalez M.E., Carrasco L. Viroporins // *FEBS Letters*. 2003. V. 552. № 1. P. 28-34.
63. Goodwill K.E., Sabatier C., Marks C., Raag R., Fitzpatrick P.F., Stevens R.C. Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases // *Nature Structural Biology*. 1997. V. 4. № 7. P. 578-585.
64. Grant E.J., Josephs T.M., Loh L., Clemens E.B., Sant S., Bharadwaj M., Chen W., Rossjohn J., Gras S., Kedzierska K. Broad CD8+ T cell cross-recognition of distinct influenza A strains in humans // *Nature Communications*. 2018. V. 9. № 1. P. 5427.
65. Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990. V. 87. № 12. P. 4645-4649.
66. Grigoryan G., Kim Y.H., Acharya R., Axelrod K., Jain R.M., Willis L., Drndic M., Kikkawa J.M., DeGrado W.F. Computational Design of Virus-Like Protein Assemblies on Carbon Nanotube Surfaces // *Science*. 2011. V. 332. № 6033. P. 1071-1076.
67. Grohskopf L.A., Sokolow L.Z., Broder K.R., Walter E.B., Fry A.M., Jernigan D.B. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2018–19 Influenza Season // *MMWR. Recommendations and Reports*. 2018. V. 67. № 03. P. 1-20.
68. Guan Y., Zhu Q., Huang D., Zhao S., Jan Lo L., Peng J. An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide // *Scientific Reports*. 2015. V. 5. № 1. P. 13370.
69. Guan Z., Liu D., Mi S., Zhang J., Ye Q., Wang M., Gao G.F., Yan J. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: implications for PKR signaling pathway // *Protein & Cell*. 2010. V. 1. № 10. P. 944-955.
70. Guo Y., He L., Song N., Li P., Sun S., Zhao G., Tai W., Jiang S., Du L., Zhou Y. Highly conserved M2e and hemagglutinin epitope-based recombinant proteins induce protection against influenza virus infection // *Microbes and Infection*. 2017. V. 19. № 12. P. 641-647.
71. Guo Y., Kammerer R.A., Engel J. The Unusually Stable Coiled-Coil Domain of COMP Exhibits Cold and Heat Denaturation in 4–6 M Guanidinium Chloride // *Biophysical Chemistry*. 2000. V. 85. P. 179-186.
72. Gutierrez A.F., Sahly H.E. Recombinant hemagglutinin protein vaccine: a new option in immunization against influenza // *Future Virology*. 2015. V. 10. № 9, P. 1057-1067.
73. Habibi N., Kamaly N., Memic A., Shafiee H. Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery // *Nano Today*. 2016. V. 11. № 1. P. 41-60.
74. Hager K.J., Pérez Marc G., Gobeil P., Diaz R.S., Heizer G., Llapur C., Makarkov A.I., Vasconcellos E., Pillet S., Riera F., Saxena P., Geller Wolff P., Bhutada K., Wallace G., Aazami H., Jones C.E., Polack F.P., Ferrara L., Atkins J., Boulay I., Dhaliwall J., Charland N., Couture M.M.J., Jiang-Wright J., Landry N., Lapointe S., Lorin A., Mahmood A., Moulton L.H., Pahmer E., Parent J., Séguin A., Tran L., Breuer T., Ceregido M.-A., Koutsoukos M., Roman F., Namba J., D'Aoust M.-A., Trepanier S., Kimura Y., Ward B.J. Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine // *New England Journal of Medicine*. 2022. V. 386. № 22. P. 2084-2096.

75. Harari A., Dutoit V., Cellerai C., Bart P., Du Pasquier R.A., Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections // *Immunological Reviews*. 2006. V. 211. № 1. P. 236-254.
76. Harbury P.B., Zhang T., Kim P.S., Alber T. A Switch Between Two-, Three-, and Four-stranded Coiled Coils in GCN4 Leucine Zipper Mutants // *Science*. 1993. V. 262. № 5138. P. 1401-1407.
77. Hashemi H., Pouyanfard S., Bandehpour M., Noroozbabaei Z., Kazemi B., Saelens X., Mokhtari-Azad T. Immunization with M2e-Displaying T7 Bacteriophage Nanoparticles Protects against Influenza A Virus Challenge // *PLoS ONE*. 2012. V. 7. № 9. P. e45765.
78. Hemmati F., Hemmati-Dinarvand M., Karimzade M., Rutkowska D., Eskandari M.H., Khanizadeh S., Afsharifar A. Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2 // *Biotechnology Letters*. 2022. V. 44. № 1. P. 45-57.
79. Hessel A., Savidis-Dacho H., Coulibaly S., Portsmouth D., Kreil T.R., Crowe B.A., Schwendinger M.G., Pilz A., Barrett P.N., Falkner F.G., Schäfer B. MVA Vectors Expressing Conserved Influenza Proteins Protect Mice against Lethal Challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 Viruses // *PLoS ONE*. 2014. V. 9. № 2. P. e88340.
80. Horn M.E., Woodard S.L., Howard J.A. Plant molecular farming: systems and products // *Plant Cell Reports*. 2004. V. 22. № 10. P. 711-720.
81. Huber V.C., Lynch J.M., Bucher D.J., Le J., Metzger D.W. Fc Receptor-Mediated Phagocytosis Makes a Significant Contribution to Clearance of Influenza Virus Infections // *The Journal of Immunology*. 2001. V. 166. № 12. P. 7381-7388.
82. Ichinohe T., Iwasaki A., Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines // *Expert Review of Vaccines*. 2008. V. 7. № 9. P. 1435-1445.
83. Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M.V., Zhu X., Hoffman R.M.B., Van Meersbergen R., Huizingh J., Wannings P., Verspuij J., De Man M., Ding Z., Apetri A., Kükler B., Sneekes-Vriese E., Tomkiewicz D., Laursen N.S., Lee P.S., Zakrzewska A., Dekking L., Tolboom J., Tettero L., Van Meerten S., Yu W., Koudstaal W., Goudsmit J., Ward A.B., Meijberg W., Wilson I.A., Radošević K. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen // *Science*. 2015. V. 349. № 6254. P. 1301-1306.
84. Indelicato G., Wahome N., Ringler P., Müller S.A., Nieh M.-P., Burkhard P., Twarock R. Principles Governing the Self-Assembly of Coiled-Coil Protein Nanoparticles // *Biophysical Journal*. 2016. V. 110. № 3. P. 646-660.
85. Jegaskanda S., Job E.R., Kramski M., Laurie K., Isitman G., De Rose R., Winnall W.R., Stratov I., Brooks A.G., Reading P.C., Kent S.J. Cross-Reactive Influenza-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Antibodies in the Absence of Neutralizing Antibodies // *The Journal of Immunology*. 2013. V. 190. № 4. P. 1837-1848.
86. Jegaskanda S., Vanderven H.A., Wheatley A.K., Kent S.J. Fc or not Fc; that is the question: Antibody Fc-receptor interactions are key to universal influenza vaccine design // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2017. V. 13. № 6. P. 1288-1296.
87. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. Influenza A Vaccine Based on the Extracellular Domain of M2: Weak Protection Mediated via Antibody-Dependent NK Cell Activity // *The Journal of Immunology*. 2004. V. 172. № 9. P. 5598-5605.
88. Jin H. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape // *The EMBO Journal*. 1997. V. 16. № 6. P. 1236-1247.
89. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. 2021. V. 596. P. 583-589.

90. Kaba S.A., Brando C., Guo Q., Mittelholzer C., Raman S., Tropel D., Aebi U., Burkhard P., Lanar D.E. A Nonadjuvanted Polypeptide Nanoparticle Vaccine Confers Long-Lasting Protection against Rodent Malaria // *The Journal of Immunology*. 2009. V. 183. № 11. P. 7268-7277.
91. Kaba S.A., Karch C.P., Seth L., Ferlez K.M.B., Storme C.K., Pesavento D.M., Laughlin P.Y., Bergmann-Leitner E.S., Burkhard P., Lanar D.E. Self-Assembling Protein Nanoparticles with Built-in Flagellin Domains Increases Protective Efficacy of a Plasmodium Falciparum Based Vaccine // *Vaccine*. 2018. V. 36. P. 906-914.
92. Kaba S.A., McCoy M.E., Doll T.A.P.F., Brando C., Guo Q., Dasgupta D., Yang Y., Mittelholzer C., Spaccapelo R., Crisanti A., Burkhard P., Lanar D.E. Protective Antibody and CD8+ T-Cell Responses to the Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein Induced by a Nanoparticle Vaccine // *PLoS ONE*. 2012. V. 7. № 10. P. e48304.
93. Kannan K., Stewart R.M., Bounds W., Carlsson S.R., Fukuda M., Betzing K.W., Holcombe R.F. Lysosome-Associated Membrane Proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) Are Activation-Dependent Cell Surface Glycoproteins in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Which Mediate Cell Adhesion to Vascular Endothelium // *Cellular Immunology*. 1996. V. 171. № 1. P. 10-19.
94. Kannanganat S., Ibegbu C., Chennareddi L., Robinson H.L., Amara R.R. Multiple-Cytokine-Producing Antiviral CD4 T Cells Are Functionally Superior to Single-Cytokine-Producing Cells // *Journal of Virology*. 2007. V. 81. № 16. P. 8468-8476.
95. Karch C.P., Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies // *Biochemical Pharmacology*. 2016. V. 120. P. 1-14.
96. Karch C.P., Li J., Kulangara C., Paulillo S.M., Raman S.K., Emadi S., Tan A., Helal Z.H., Fan Q., Khan M.I., Burkhard P. Vaccination with Self-Adjuvanted Protein Nanoparticles Provides Protection against Lethal Influenza Challenge // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017. V. 13. P. 241-251.
97. Keshavarz M., Namdari H., Arjeini Y., Mirzaei H., Salimi V., Sadeghi A., Mokhtari-Azad T., Rezaei F. Induction of protective immune response to intranasal administration of influenza virus-like particles in a mouse model // *Journal of Cellular Physiology*. 2019. V. 234. № 9. P. 16643-16652.
98. Khanna M., Sharma S., Kumar B., Rajput R. Protective Immunity Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain and Its Prospects for Universal Influenza Vaccine Development // *BioMed Research International*. 2014. V. 2014. P. 1-7.
99. Kosik I., Angeletti D., Gibbs J.S., Angel M., Takeda K., Kosikova M., Nair V., Hickman H.D., Xie H., Brooke C.B., Yewdell J.W. Neuraminidase inhibition contributes to influenza A virus neutralization by anti-hemagglutinin stem antibodies // *Journal of Experimental Medicine*. 2019. V. 216. № 2. P. 304-316.
100. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination // *Nature Reviews Immunology*. 2019. V. 19. № 6. P. 383-397.
101. Krammer F., Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015. V. 14. № 3. P. 167-182.
102. Kreijtz J.H.C.M., Bodewes R., Van Den Brand J.M.A., De Mutsert G., Baas C., Van Amerongen G., Fouchier R.A.M., Osterhaus A.D.M.E., Rimmelzwaan G.F. Infection of mice with a human influenza A/H3N2 virus induces protective immunity against lethal infection with influenza A/H5N1 virus // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 36. P. 4983-4989.
103. Kuhn D.A., Vanhecke D., Michen B., Blank F., Gehr P., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages //

- Beilstein Journal of Nanotechnology. 2014. V. 5. P. 1625-1636.
104. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.
 105. Lakshmanan A., Zhang S., Hauser C.A.E. Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices // *Trends in Biotechnology*. 2012. V. 30. № 3. P. 155-165.
 106. Lam J.H., Baumgarth N. The Multifaceted B Cell Response to Influenza Virus // *The Journal of Immunology*. 2019. V. 202. № 2. P. 351-359.
 107. Leclerc D., Rivest M., Babin C., López-Macias C., Savard P. A Novel M2e Based Flu Vaccine Formulation for Dogs // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. № 10. P. e77084.
 108. Lee A., Karplus P., Ganem B., Clardy J. Atomic Structure of the Buried Catalytic Pocket of Escherichia Coli Chorismate Mutase // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 3627-3628.
 109. Lee L.Y.-H., Ha D.L.A., Simmons C., De Jong M.D., Chau N.V.V., Schumacher R., Peng Y.C., McMichael A.J., Farrar J.J., Smith G.L., Townsend A.R.M., Askonas B.A., Rowland-Jones S., Dong T. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals // *Journal of Clinical Investigation*. 2008. P. JCI32460.
 110. Lee Y.-N., Kim M.-C., Lee Y.-T., Kim Y.-J., Kang S.-M. Mechanisms of Cross-protection by Influenza Virus M2-based Vaccines // *Immune Network*. 2015. V. 15. № 5. P. 213.
 111. Liu H., Timko M.P. Improving Protein Quantity and Quality—The Next Level of Plant Molecular Farming // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. № 3. P. 1326.
 112. Liu W., Zou P., Ding J., Lu Y., Chen Y.H. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design // *Microbes and Infection*. 2005. V. 7. № 2. P. 171–177.
 113. Lomonosoff G.P., D’Aoust M.-A. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment // *Science*. 2016. V. 353. № 6305. P. 1237-1240.
 114. López-Sagaseta J., Malito E., Rappuoli R., Bottomley M.J. Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2016. V. 14. P. 58-68.
 115. Lupas A.N., Gruber M. The Structure of α -Helical Coiled Coils // *Advances in Protein Chemistry*. 2005. V. 70. P. 37-38.
 116. Malashkevich V., Kammerer R., Efimov V., Schulthess T., Engel J. The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel? // *Science*. 1996. V. 274. № 5288. P. 761-765.
 117. Mandal D., Nasrolahi Shirazi A., Parang K. Self-assembly of peptides to nanostructures // *Org. Biomol. Chem*. 2014. V. 12. № 22. P. 3544-3561.
 118. Mardanova E.S., Blokhina E.A., Tsybalova L.M., Peyret H., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Efficient Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants by the Novel pEff Vector Based on the Genome of Potato Virus X // *Frontiers in Plant Science*. 2017. V. 8.
 119. Mardanova E.S., Kotlyarov R.Y., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors // *BMC Biotechnology*. 2015. V. 15. № 1. P. 42.
 120. Mardanova E.S., Kotlyarov R.Y., Stuchinskaya M.D., Nikolaeva L.I., Zahmanova G., Ravin N.V. High-Yield Production of Chimeric Hepatitis E Virus-Like Particles Bearing the M2e

Influenza Epitope and Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 in Plants Using Viral Vectors // International Journal of Molecular Sciences. 2022. V. 23. № 24. P. 15684.

121. Marsh J.A., Hernández H., Hall Z., Ahnert S.E., Perica T., Robinson C.V., Teichmann S.A. Protein Complexes Are under Evolutionary Selection to Assemble via Ordered Pathways // *Cell*. 2013. V. 153. № 2. P. 461-470.
122. Mason J.M., Arndt K.M. Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications // *ChemBioChem*. 2004. V. 5. Coiled Coil Domains. № 2. P. 170-176.
123. Mazanec M.B., Coudret C.L., Fletcher D.R. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies // *Journal of Virology*. 1995. V. 69. № 2. P. 1339-1343.
124. McCown M.F., Pekosz A. Distinct Domains of the Influenza A Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Mediate Binding to the M1 Protein and Facilitate Infectious Virus Production // *Journal of Virology*. 2006. V. 80. № 16. P. 8178-8189.
125. McCoy M.E., Golden H.E., Doll T.A., Yang Y., Kaba S.A., Burkhard P., Lanar D.E. Mechanisms of protective immune responses induced by the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-based, self-assembling protein nanoparticle vaccine // *Malaria Journal*. 2013. V. 12. № 1. P. 136.
126. Meier M., Lustig A., Aebi U., Burkhard P. Removing an Interhelical Salt Bridge Abolishes Coiled-Coil Formation in a de Novo Designed Peptide // *Journal of Structural Biology*. 2002. V. 137. № 1-2. P. 65-72.
127. Mould J.A., Drury J.E., Frings S.M., Kaupp U.B., Pekosz A., Lamb R.A., Pinto L.H. Permeation and Activation of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. V. 275. № 40. P. 31038-31050.
128. Music N., Reber A.J., Kim M.-C., York I.A., Kang S.-M. Supplementation of H1N1pdm09 split vaccine with heterologous tandem repeat M2e5x virus-like particles confers improved cross-protection in ferrets // *Vaccine*. 2016. V. 34. № 4. P. 466-473.
129. Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein // *Nature Medicine*. 1999. V. 5. № 10. P. 1157-1163.
130. Neumann G. H5N1 influenza virulence, pathogenicity and transmissibility: what do we know? // *Future Virology*. 2015. V. 10. № 8. P. 971-980.
131. Neumann G., Noda T., Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus // *Nature*. 2009. V. 459. № 7249. P. 931-939.
132. Newcomb L., Kuo R.-L., Ye Q., Jiang Y., Tao Y., Krug R. Interaction of the Influenza A Virus Nucleocapsid Protein with the Viral RNA Polymerase Potentiates Unprimed Viral RNA Replication // *J Virol*. 2009. V. 83. P. 29-36.
133. Nosaki S., Miura K. Transient expression of recombinant proteins in plants // *Methods in Enzymology*. 2021. V. 660. P. 193-203.
134. Obayashi E., Yoshida H., Kawai F., Shibayama N., Kawaguchi A., Nagata K., Tame J.R.H., Park S.-Y. The Structural Basis for an Essential Subunit Interaction in Influenza Virus RNA Polymerase // *Nature*. 2008. V. 454. P. 1127-1131.
135. Orlov V.N., Arutyunyan A.M., Kust S.V., Litmanovich E.A., Drachev V.A., Dobrov E.N. Macroscopic Aggregation of Tobacco Mosaic Virus Coat Protein // *Biochemistry (Moscow)*. 2001. V. 66. № 2. P. 154-162.
136. Outlaw M.C., Dimmock N.J. IgG Neutralization of Type A Influenza Viruses and the

- Inhibition of the Endosomal Fusion Stage of the Infectious Pathway in BHK Cells // *Virology*. 1993. V. 195. № 2. P. 413-421.
137. Ozawa M., Fujii K., Muramoto Y., Yamada S., Yamayoshi S., Takada A., Goto H., Horimoto T., Kawaoka Y. Contributions of Two Nuclear Localization Signals of Influenza A Virus Nucleoprotein to Viral Replication // *J Virol*. 2007. V. 81. P. 30–41.
138. Ozbek S., Engel J., Stetefeld J. Storage function of cartilage oligomeric matrix protein: the crystal structure of the coiled-coil domain in complex with vitamin D3 // *The EMBO Journal*. 2002. V. 21. № 22. P. 5960-5968.
139. Padilla J.E., Colovos C., Yeates T.O. Nanohedra: Using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals, and filaments // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. V. 98. № 5. P. 2217-2221.
140. Peiris M., Yam W.C., Chan K.H., Ghose P., Shortridge K.F. Influenza A H9N2: Aspects of Laboratory Diagnosis // *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. V. 37. № 10. P. 3426-3427.
141. Petukhova N., Gasanova T., Stepanova L., Rusova O., Potapchuk M., Korotkov A., Skurat E., Tsybalova L., Kiselev O., Ivanov P., Atabekov J. Immunogenicity and Protective Efficacy of Candidate Universal Influenza A Nanovaccines Produced in Plants by Tobacco Mosaic Virus-based Vectors // *Current Pharmaceutical Design*. 2013. V. 19. № 31. P. 5587-5600.
142. Pimentel T.A.P.F., Yan Z., Jeffers S.A., Holmes K.V., Hodges R.S., Burkhard P. Peptide Nanoparticles as Novel Immunogens: Design and Analysis of a Prototypic Severe Acute Respiratory Syndrome Vaccine // *Chemical Biology & Drug Design*. 2009. V. 73. № 1. P. 53-61.
143. Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity // *Cell*. 1992. V. 69. № 3. P. 517-528.
144. Pinto L.H., Lamb R.A. The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses // *Journal of Biological Chemistry*. 2006. V. 281. № 14. P. 8997-9000.
145. Pleguezuelos O., Robinson S., Stoloff G.A., Caparrós-Wanderley W. Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial // *Vaccine*. 2012. V. 30. № 31. P. 4655-4660.
146. Potter C.W. A history of influenza // *Journal of Applied Microbiology*. 2001. V. 91. № 4. P. 572-579.
147. Qi M., Zhang X., Sun X., Zhang X., Yao Y., Liu S., Chen Z., Li W., Zhang Z., Chen J., Cui Z. Intranasal Nanovaccine Confers Homo- and Hetero-Subtypic Influenza Protection // *Small*. 2018. V. 14. № 13. P. 1703207.
148. Raman S., Machaidze G., Lustig A., Aebi U., Burkhard P. Structure-based design of peptides that self-assemble into regular polyhedral nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006. V. 2. № 2. P. 95-102.
149. Raman S., Machaidze G., Lustig A., Olivieri V., Aebi U., Burkhard P. Design of Peptide Nanoparticles Using Simple Protein Oligomerization Domains // *The Open Nanomedicine Journal*. 2009. V. 2. № 1. P. 15-26.
150. Ravin N.V., Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Shaldjan A.A., Kovaleva A.A., Tsybalova L.M., Skryabin K.G. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective efficiency // *Vaccine*. 2015. V. 33. № 29. P. 3392-3397.
151. Ravin N.V., Kotlyarov R.Y., Mardanov E.S., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Skryabin K.G. Plant-produced recombinant influenza vaccine based

- on virus-like Hbc particles carrying an extracellular domain of M2 protein // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V. 77. № 1. P. 33-40.
152. Renegar K.B., Small P.A., Boykins L.G., Wright P.F. Role of IgA versus IgG in the Control of Influenza Viral Infection in the Murine Respiratory Tract // *The Journal of Immunology*. 2004. V. 173. № 3. P. 1978-1986.
153. Ringler P., Schulz G.E. Self-Assembly of Proteins into Designed Networks // *Science*. 2003. V. 302. № 5642. P. 106-109.
154. Robinson C.R., Sauer R.T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. V. 95. № 11. P. 5929-5934.
155. Rosa D., Tzelepis F., Cunha M., Soares I., Rodrigues M. The Pan HLA DR-Binding Epitope Improves Adjuvant-Assisted Immunization with a Recombinant Protein Containing a Malaria Vaccine Candidate // *Immunology Letters*. 2004. V. 92. P. 259-268.
156. Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W., Rota J.S., Kendal A.P., Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 // *Virology*. 1990. V. 175. № 1. P. 59-68.
157. Rotzschke O., Falk K., Stevanovic S., Jung G., Walden P., Rammensee H. Exact prediction of a natural T cell epitope // *European Journal of Immunology*. 1991. V. 21. № 11. P. 2891-2894.
158. Rudra J.S., Sun T., Bird K.C., Daniels M.D., Gasiorowski J.Z., Chong A.S., Collier J.H. Modulating Adaptive Immune Responses to Peptide Self-Assemblies // *ACS Nano*. 2012. V. 6. № 2. P. 1557-1564.
159. Rybicki E.P. Plant-based vaccines against viruses // *Virology Journal*. 2014. V. 11. № 1. P. 205.
160. Saelens X. The Role of Matrix Protein 2 Ectodomain in the Development of Universal Influenza Vaccines // *The Journal of Infectious Diseases*. 2019. V. 219. P. S68-S74.
161. Sainsbury F. Innovation in plant-based transient protein expression for infectious disease prevention and preparedness // *Current Opinion in Biotechnology*. 2020. V. 61. P. 110-115.
162. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition // Cold Spring Harbor Laboratory Press New York USA. 1989.
163. Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle // *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2009. V. 82. № 4. P. 153-159.
164. Saunders K., Thuenemann E.C., Shah S.N., Peyret H., Kristianingsih R., Lopez S.G., Richardson J., Lomonosoff G.P. The Use of a Replicating Virus Vector For in Planta Generation of Tobacco Mosaic Virus Nanorods Suitable For Metallization // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. V. 10. P. 877361.
165. Schillberg S., Finnern R. Plant molecular farming for the production of valuable proteins – Critical evaluation of achievements and future challenges // *Journal of Plant Physiology*. 2021. V. 258-259. P. 153359.
166. Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments // *Expert Review of Vaccines*. 2009. V. 8. № 4. P. 499-508.
167. Sedova E.S., Scherbinin D.N., Lysenko A.A., Alekseeva S.V., Artemova E.A., Shmarov M.M. Non-neutralizing Antibodies Directed at Conservative Influenza Antigens // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 4. P. 22-32.

168. Selman M., Dankar S.K., Forbes N.E., Jia J.-J., Brown E.G. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing // *Emerging Microbes & Infections*. 2012. V. 1. № 1. P. 1-10.
169. Shinde V., Cho I., Plested J.S., Agrawal S., Fiske J., Cai R., Zhou H., Pham X., Zhu M., Cloney-Clark S., Wang N., Zhou B., Lewis M., Price-Abbott P., Patel N., Massare M.J., Smith G., Keech C., Fries L., Glenn G.M. Comparison of the safety and immunogenicity of a novel Matrix-M-adjuvanted nanoparticle influenza vaccine with a quadrivalent seasonal influenza vaccine in older adults: a phase 3 randomised controlled trial // *The Lancet Infectious Diseases*. 2022. V. 22. № 1. P. 73-84.
170. Shu L.L., Bean W.J., Webster R.G. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990 // *Journal of Virology*. 1993. V. 67. № 5. P. 2723-2729.
171. Smith D.B., Gaunt E.R., Digard P., Templeton K., Simmonds P. Detection of influenza C virus but not influenza D virus in Scottish respiratory samples // *Journal of Clinical Virology*. 2016. V. 74. P. 50-53.
172. Song B.-M., Kang H.-M., Lee E.-K., Jung S.C., Kim M.-C., Lee Y.-N., Kang S.-M., Lee Y.-J. Supplemented vaccination with tandem repeat M2e virus-like particles enhances protection against homologous and heterologous HPAI H5 viruses in chickens // *Vaccine*. 2016. V. 34. № 5. P. 678-686.
173. Spitaels J., Roose K., Saelens X. Influenza and Memory T Cells: How to Awake the Force // *Vaccines*. 2016. V. 4. № 4. P. 33.
174. Sridhar S. Heterosubtypic T-Cell Immunity to Influenza in Humans: Challenges for Universal T-Cell Influenza Vaccines // *Frontiers in Immunology*. 2016. V. 7.
175. Staneková Z., Varečková E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development // *Virology Journal*. 2010. V. 7. № 1. P. 351.
176. Steel J., Lowen A.C., Wang T.T., Yondola M., Gao Q., Haye K., García-Sastre A., Palese P. Influenza Virus Vaccine Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain // *mBio*. 2010. V. 1. № 1. P. e00018-10.
177. Stepanova L.A., Kotlyarov R.Y., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., Kasianenko M.A., Kuprianov V.V., Ravin N.V., Tsybalova L.M., Skryabin K.G., Kiselev O.I. Protection against Multiple Influenza A Virus Strains Induced by Candidate Recombinant Vaccine Based on Heterologous M2e Peptides Linked to Flagellin // *PLOS ONE*. 2015. V. 10. № 3. P. e0119520.
178. Stepanova L.A., Mardanova E.S., Shuklina M.A., Blokhina E.A., Kotlyarov R.Y., Potapchuk M.V., Kovaleva A.A., Vidyaeva I.G., Korotkov A.V., Eletskaia E.I., Ravin N.V., Tsybalova L.M. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes // *Journal of Biomedical Science*. 2018. V. 25. № 1. P. 33.
179. Stepanova L.A., Shuklina M.A., Blokhina E.A., Kotlyarov R.Y., Kovaleva A.A., Ravin N.V., Tsybalova L.M. Effectiveness of cross-protective recombinant influenza vaccine based on conserved epitopes of viral proteins M2 and hemagglutinin // *Journal Infectology*. 2017. V. 9. № 4. P. 43-52.
180. Stoloff G.A., Caparros-Wanderley W. Synthetic multi-epitope peptides identified in silico induce protective immunity against multiple influenza serotypes // *European Journal of Immunology*. 2007. V. 37. № 9. P. 2441-2449.

181. Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., Wan H., Murakami A., Yammanuru A., Han T., Cox N.J., Bankston L.A., Donis R.O., Liddington R.C., Marasco W.A. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2009. V. 16. № 3. P. 265-273.
182. Sun H., Zhang X., Miao L., Zhao L., Luo Q., Xu J., Liu J. Micelle-Induced Self-Assembling Protein Nanowires: Versatile Supramolecular Scaffolds for Designing the Light-Harvesting System // *ACS Nano*. 2016. V. 10. № 1. P. 421-428.
183. Sun X., Wang Y., Dong C., Hu J., Yang L. High copy numbers and N terminal insertion position of influenza A M2E fused with hepatitis B core antigen enhanced immunogenicity // *BioScience Trends*. 2015. V. 9. № 4. P. 221-227.
184. Swain S.L., McKinstry K.K., Strutt T.M. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses // *Nature Reviews Immunology*. 2012. V. 12. № 2. P. 136-148.
185. Szeto W.-C., Hsia H.-P., Tang Y.-S., Shaw P.-C. Interaction between Influenza A Virus Nucleoprotein and PB2 Cap-Binding Domain Is Mediated by RNA // *PLoS ONE*. 2020. V. 15. P. e0239899.
186. Tamura S., Tanimoto T., Kurata T. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2005. V. 58. № 4. P. 195-207.
187. Tan G.S., Lee P.S., Hoffman R.M.B., Mazel-Sanchez B., Krammer F., Leon P.E., Ward A.B., Wilson I.A., Palese P. Characterization of a Broadly Neutralizing Monoclonal Antibody That Targets the Fusion Domain of Group 2 Influenza A Virus Hemagglutinin // *Journal of Virology*. 2014. V. 88. № 23. P. 13580-13592.
188. Tao Y., Strelkov S.V., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain // *Structure*. 1997. V. 5. № 6. P. 789-798.
189. Terajima M., Babon J.A.B., Co M.D.T., Ennis F.A. Cross-reactive human B cell and T cell epitopes between influenza A and B viruses // *Virology Journal*. 2013. V. 10. № 1. P. 244.
190. Thomas P.G., Keating R., Hulse-Post D.J., Doherty P.C. Cell-mediated Protection in Influenza Infection // *Emerging Infectious Diseases*. 2006. V. 12. № 1. P. 48-54.
191. Townsend A.R.M., Gotch F.M., Davey J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein // *Cell*. 1985. V. 42. № 2. P. 457-467.
192. Umbach J.L., Yen H.-L., Poon L.L.M., Cullen B.R. Influenza A Virus Expresses High Levels of an Unusual Class of Small Viral Leader RNAs in Infected Cells // *mBio*. 2010. V. 1. № 4. P. e00204-10.
193. Usui K., Maki T., Ito F., Suenaga A., Kidoaki S., Itoh M., Taiji M., Matsuda T., Hayashizaki Y., Suzuki H. Nanoscale elongating control of the self-assembled protein filament with the cysteine-introduced building blocks // *Protein Science*. 2009. V. 18. № 5. P. 960-969.
194. Van De Sandt C.E., Kreijtz J.H.C.M., De Mutsert G., Geelhoed-Mieras M.M., Hillaire M.L.B., Vogelzang-van Trierum S.E., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Rimmelzwaan G.F. Human Cytotoxic T Lymphocytes Directed to Seasonal Influenza A Viruses Cross-React with the Newly Emerging H7N9 Virus // *Journal of Virology*. 2014. V. 88. № 3. P. 1684-1693.
195. Van Doorn E., Liu H., Ben-Yedidia T., Hassin S., Visontai I., Norley S., Frijlink H.W., Hak E. Evaluating the immunogenicity and safety of a BiondVax-developed universal influenza vaccine (Multimeric-001) either as a standalone vaccine or as a primer to H5N1 influenza vaccine: Phase IIb study protocol // *Medicine*. 2017. V. 96. № 11. P. e6339.

196. Vichier-Guerre S., Lo-Man R., BenMohamed L., Dériaud E., Kovats S., Leclerc C., Bay S. Induction of carbohydrate-specific antibodies in HLA-DR transgenic mice by a synthetic glycopeptide: a potential anti cancer vaccine for human use // *The Journal of Peptide Research*, 2003, V. 62, Induction of carbohydrate-specific antibodies in HLA-DR transgenic mice by a synthetic glycopeptide. № 3. P. 117-124.
197. Von Heijne G. The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology // *The EMBO Journal*. 1986. V. 5. № 11. P. 3021-3027.
198. Wahome N., Pfeiffer T., Ambiel I., Yang Y., Keppler O.T., Bosch V., Burkhard P. Conformation-specific Display of 4E10 and 2F5 Epitopes on Self-assembling Protein Nanoparticles as a Potential HIV Vaccine // *Chemical Biology & Drug Design*. 2012. V. 80. № 3. P. 349-357.
199. Wang R., Song A., Levin J., Dennis D., Zhang N., Yoshida H., Koriazova L., Madura L., Shapiro L., Matsumoto A. Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein // *Antiviral Research*. 2008. V. 80. № 2. P. 168-177.
200. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., Wilson I.A., García-Sastre A., Moran T.M., Palese P. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. V. 107. № 44. P. 18979-18984.
201. Ward B.J., Makarkov A., Seguin A., Pillet S., Trepanier S., Dhaliwall J., Libman M.D., Vesikari T., Landry N. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18-64 years) and older adults (≥ 65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials // *Lancet*. 2020. V. 396. P. 1491-1503.
202. Weber J.S., Hua F.L., Spears L., Marty V., Kuniyoshi C., Celis E. A Phase I Trial of an HLA-A1 Restricted MAGE-3 Epitope Peptide with Incomplete Freund's Adjuvant in Patients with Resected High-Risk Melanoma: // *Journal of Immunotherapy*. 1999. V. 22. № 5. P. 431-440.
203. Whitby F.G., Phillips G.N. Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution // *Proteins*. 2000. V. 38. № 1. P. 49-59.
204. Wise H.M., Foeglein A., Sun J., Dalton R.M., Patel S., Howard W., Anderson E.C., Barclay W.S., Digard P. A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA // *Journal of Virology*. 2009. V. 83. № 16. P. 8021-8031.
205. Wise H.M., Hutchinson E.C., Jagger B.W., Stuart A.D., Kang Z.H., Robb N., Schwartzman L.M., Kash J.C., Fodor E., Firth A.E., Gog J.R., Taubenberger J.K., Digard P. Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain // *PLoS Pathogens*. 2012. V. 8. № 11. P. e1002998.
206. Wohlbold T.J., Chromikova V., Tan G.S., Meade P., Amanat F., Comella P., Hirsh A., Krammer F. Hemagglutinin Stalk- and Neuraminidase-Specific Monoclonal Antibodies Protect against Lethal H10N8 Influenza Virus Infection in Mice // *Journal of Virology*. 2016. V. 90. № 2. P. 851-861.
207. Wu C-Y., Monie A., Pang X., Hung C-F., Wu T. Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4+ T help and dendritic cell activation // *J Biomed Sci*. 2010. V. 17. № 1. P. 88.
208. Wu N.C., Zost S.J., Thompson A.J., Oyen D., Nycholat C.M., McBride R., Paulson J.C., Hensley S.E., Wilson I.A. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine // *PLOS Pathogens*. 2017. V. 13. № 10. P. e1006682.

209. Yang J., Xu C., Wang C., Kopeček J. Refolding Hydrogels Self-Assembled from N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Graft Copolymers by Antiparallel Coiled-Coil Formation // *Biomacromolecules*. 2006. V. 7. № 4. P. 1187-1195.
210. Yang Y., Ringler P., Müller S.A., Burkhard P. Optimizing the refolding conditions of self-assembling polypeptide nanoparticles that serve as repetitive antigen display systems // *Journal of Structural Biology*. 2012. V. 177. № 1. P. 168-176.
211. Yano Y., Yano A., Oishi S., Sugimoto Y., Tsujimoto G., Fujii N., Matsuzaki K. Coiled-Coil Tag-Probe System for Quick Labeling of Membrane Receptors in Living Cells // *ACS Chemical Biology*. 2008. V. 3. № 6. P. 341-345.
212. Yewdell J.W., Bennink J.R., Smith G.L., Moss B. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985. V. 82. № 6. P. 1785-1789.
213. Young B., Sadarangani S., Jiang L., Wilder-Smith A., Chen M.I.-C. Duration of Influenza Vaccine Effectiveness: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression of Test-Negative Design Case-Control Studies // *The Journal of Infectious Diseases*. 2018. V. 217. № 5. P. 731-741.
214. Zahmanova G., Takova K., Valkova R., Toneva V., Minkov I., Andonov A., Lukov G.L. Plant-Derived Recombinant Vaccines against Zoonotic Viruses // *Life*. 2022. V. 12. № 2. P. 156.
215. Zahmanova G.G., Mazalovska M., Takova K.H., Toneva V.T., Minkov I.N., Mardanova E.S., Ravin N.V., Lomonosoff G.P. Rapid High-Yield Transient Expression of Swine Hepatitis E ORF2 Capsid Proteins in *Nicotiana benthamiana* Plants and Production of Chimeric Hepatitis E Virus-Like Particles Bearing the M2e Influenza Epitope // *Plants*. 2019. V. 9. № 1. P. 29.
216. Zebedee S.L., Lamb R.A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions // *Journal of Virology*. 1988. V. 62. № 8. P. 2762-2772.
217. Zhang G., Li D., Zhang H., Zeng Y., Chen L. Enhancement of mucosal immune response against the M2eHBc+ antigen in mice with the fusion expression products of LTB and M2eHBc+ through mucosal immunization route // *Veterinary Research Communications*. 2009. V. 33. № 7. P. 735-747.
218. Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly // *Nature Biotechnology*. 2003. V. 21. № 10. P. 1171-1178.
219. Блохина Е.А., Марданова Е.С., Цыбалова Л.М., Равин Н.В. Экспрессия в растениях рекомбинантного белка на основе флагеллина, содержащего консервативные участки М2 белка и гемагглютинаина вируса гриппа // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. С. 385-390.
220. Степанова Л. А., Котляров Р. Ю., Шуклина М. А., Блохина Е. А., Сергеева М. В., Потапчук М. В., Ковалева А. А., Равин Н. В., Цыбалова Л. М. Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2e вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков // *АКТА NATURAE*. 2018. Т. 10. №1. С. 90-100.
221. Цыбалова Л. М., Котляров Р.Ю., Блохина Е. А., Шуклина М.А., Марданова Е.С., Коротков А. В., Потапчук М. В., Равин Н. В. Усиление эффективности кандидатной вакцины против гриппа сочетанием консервативных последовательностей гемагглютинаина и М2 белка // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017. №3. С. 65-71.