

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**ЗЫКОВА АННА АНДРЕЕВНА**

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

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

МОСКВА – 2024 г.

Работа выполнена в лаборатории систем молекулярного клонирования Института Биотехнологии им. К.Г. Скрябина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук»

**Научный руководитель:** **Куприянов Виктор Васильевич**, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:** **Васин Андрей Владимирович**  
доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт биомедицинских систем и биотехнологий, директор института

**Соловьев Андрей Геннадьевич**  
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, заведующий отделом биохимии вирусов растений

**Тимофеева Татьяна Анатольевна**  
кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, руководитель лаборатории физиологии вирусов

Защита диссертации состоится 12 декабря 2024 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3222>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ ноября 2024г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность 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. Когда 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).

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 спонтанно собираться в наноразмерные структуры.

Введение чужеродных эпитопов в капсидные белки позволяет получать рекомбинантные белки капсидов, 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 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 ранее успешно использованы для презентации коротких антигенов. 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 М2 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 гемагглютинина (HA2) и эпитопы нуклеопротеина. Полученные в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе самособирающегося пептида SAP после рефолдинга *in vitro* образуют наноразмерные частицы. Наночастицы на основе 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 вируса гриппа, а также образование антиген-специфичных многофункциональных CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток памяти, секретирующих цитокины.

С помощью растительной системы экспрессии был получен рекомбинантный белок на основе 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 кандидатных противогриппозных 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 металл-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 M2e и вируса гриппа А, образование M2e-специфичных многофункциональных CD4<sup>+</sup> 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 гемагглютинина HA2 и M2e пептид вируса гриппа А, образует наночастицы сферической формы. При иммунизации мышей препарат индуцирует гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ против M2e и вируса гриппа А, и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

### **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.

### **Степень достоверности результатов**

В ходе работы применялись современные методы исследования. Эксперименты проводились на современном оборудовании с использованием реактивов от ведущих производителей. Все результаты, представленные в работе, являются статистически достоверными и воспроизводимыми.

### **Апробация результатов**

Результаты работы были представлены автором на научных конференциях: 20-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» 2016 (Пушино), 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).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах.

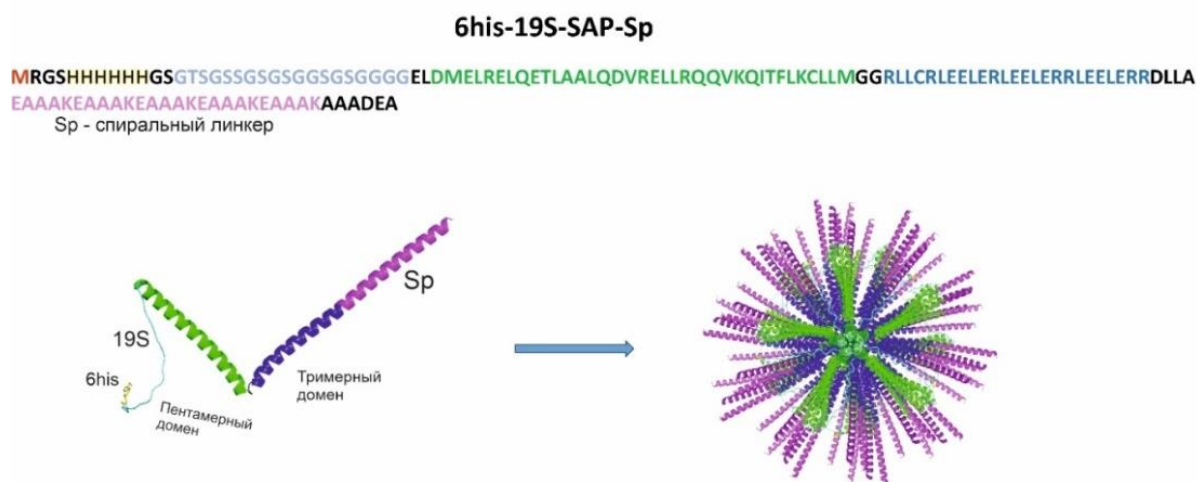
### **Структура и объем диссертации**

Материалы диссертации изложены на 119 страницах машинописного текста и включают 46 рисунков и 7 таблиц. Диссертация состоит из разделов: “Содержание”, “Список использованных сокращений”, “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Список публикаций по теме диссертации” и “Список литературы”, который содержит 221 источник.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, в бактериальной системе экспрессии.

В качестве носителя антигенов вируса гриппа были использованы наночастицы на основе самособирающегося пептида (SAP) (Raman *et al.*, 2006). N-конец пептида SAP представляет собой модифицированный пентамерный спиральный домен олигомерного матричного белка хряща (Malashkevich *et al.*, 1996), за которым следует аминокислотная последовательность, соответствующая тримерному спиральному домену (Raman *et al.*, 2006). Два домена олигомеризации соединены линкером, состоящим из двух остатков глицина. На N-конце была размещена последовательность из 6 гистидинов, отделенная от SAP гибким глицин-богатым линкером (19S). Она обеспечивает возможность очистки рекомбинантного белка с помощью металл-аффинной хроматографии. На C-конец SAP был введен дополнительный спиральный линкер (Sp) для разделения SAP и целевых антигенов. Введение этого линкера увеличивает расстояние между антигеном и образованным SAP «ядром» наночастицы, тем самым облегчает сборку наночастицы и повышает доступность антигенов для иммунной системы. После денатурации и последующего рефолдинга белки, содержащие SAP, самособираются в наноразмерные частицы (Рис. 1).



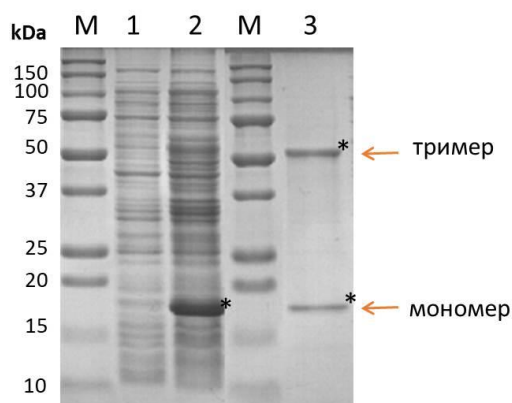
**Рисунок 1.** Самособирающийся в частицы пептид 19S-SAP-Sp со спиральным линкером Sp на C-конце. Представлена аминокислотная последовательность рекомбинантного белка, 3D-модель мономера и сборка наночастиц T=1 (60 мономеров). 3D-модель мономера получена с помощью программы AlphaFold v2.3.1, визуализация с помощью программы PyMOL.

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

Аминокислотные последовательности: **SAP** (DMELRELQETLAALQDVRELLRQQ VK QITFLKCLLMGGRLLCRLEELERLEELERRLEELER), **Sp** (EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK), **19s** – (GSGTSGSSGSGSGGGSGSGG).

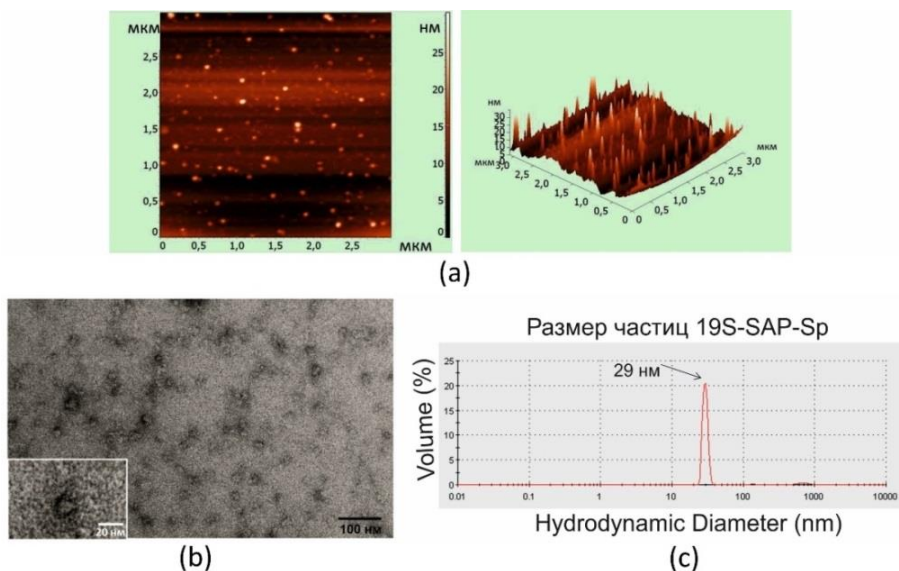


Синтетический ген, кодирующий SAP пептид со спиральным линкером Sp на С-конце и 19s линкером на N-конце, был клонирован в плазмидном векторе pQE30. Для экспрессии рекомбинантный вектор pQE30 19S-SAP-Sp вводили в штамм *E. coli* DLT1270. Для индукции экспрессии белка вносили ИПТГ до 1 мМ. Анализ белковых препаратов с помощью SDS-PAGE показал, что белок 19S-SAP-Sp эффективно экспрессируется (Рис. 2). Очистку белка 19S-SAP-Sp проводили в денатурирующих условиях с помощью металл-аффинной хроматографии. Препарат очищенного белка помимо мономерной формы также содержал агрегаты, предположительно тримеры (Рис. 2).



**Рисунок 2.** Экспрессия и очистка рекомбинантного белка 19S-SAP-Sp. SDS-PAGE анализ. 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 (\*)

Белок 19s-SAP-Sp после рефолдинга со ступенчатым понижением концентрации мочевины формирует частицы размером 15-25 нм по данным электронной и атомно-силовой микроскопии. Анализ частиц методом динамического светорассеяния показал, что их гидродинамический диаметр составляет  $29 \pm 2$  нм (Рис. 3).



**Рисунок 3.** Анализ структуры частиц 19s-SAP-Sp с помощью атомно-силовой микроскопии (a), электронной микроскопии (b), и анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (c).

Таким образом, получены наночастицы на основе самособирающегося пептида SAP со спиральным линкером Sp, присоединенным к С-концу SAP. Эти частицы могут быть

носителями целевых антигенов, представляющими на поверхности большое число копий антигена, что является важным фактором для индукции эффективного иммунного ответа

*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.*

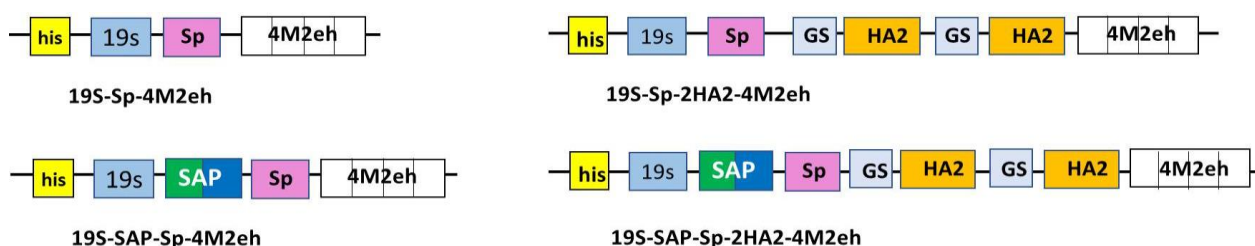
В качестве консервативных эпитопов вируса гриппа были выбраны внеклеточный домен M2 белка (M2e) и консервативная область (76-130 а.о.) второй (HA2) субъединицы гемагглютинина вируса гриппа. Антитела против M2e обеспечивают защиту посредством механизма антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) инфицированных клеток. Консервативные последовательности в стволовой области второй субъединицы (HA2) могут индуцировать образование антител против широкого спектра гемагглютининов различных подтипов.

Используемые последовательности целевых пептидов:

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

**HA2** (RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNLFEKTRRQLRENA) - консервативный участок гемагглютинина HA2-2 (76-130 а.о.), консенсусная последовательность вирусов гриппа A/H3N2 и A/H7N9 (Stepanova *et al.*, 2018).

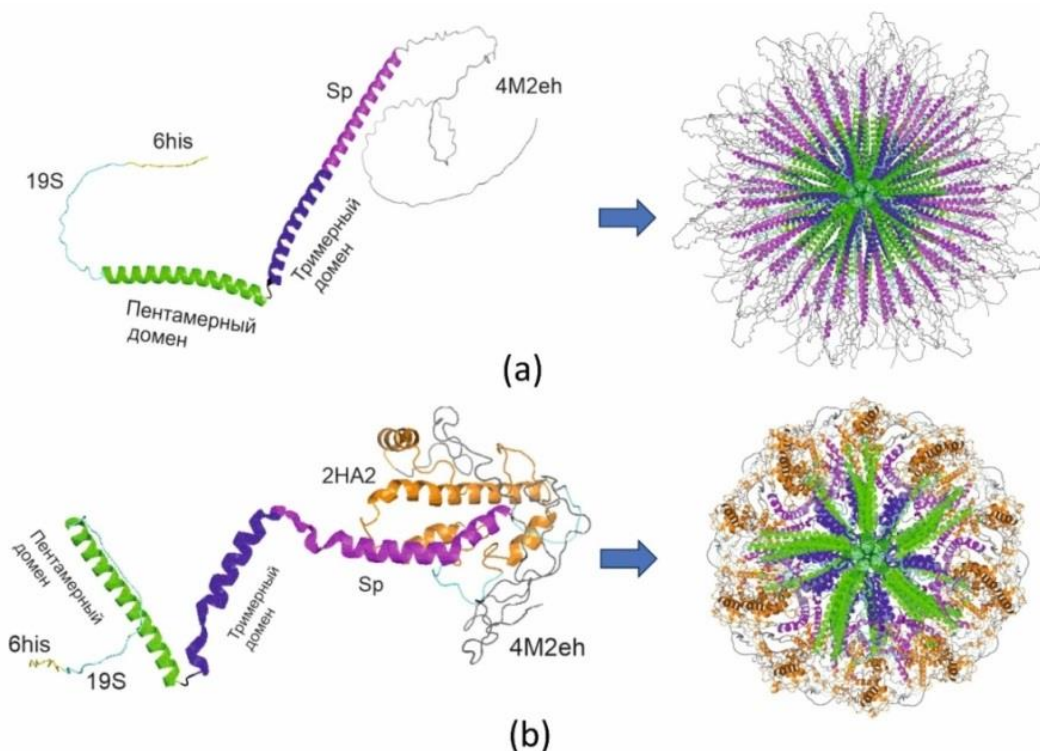
Было спроектировано четыре рекомбинантных белка: два белка с SAP пептидом, которые должны образовывать наночастицы (19s-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh), и два контрольных белка без SAP (19s-Sp-4M2eh и 19s-Sp-2HA2-4M2eh) (Рис. 4).



**Рисунок 4.** Структуры рекомбинантных белков.

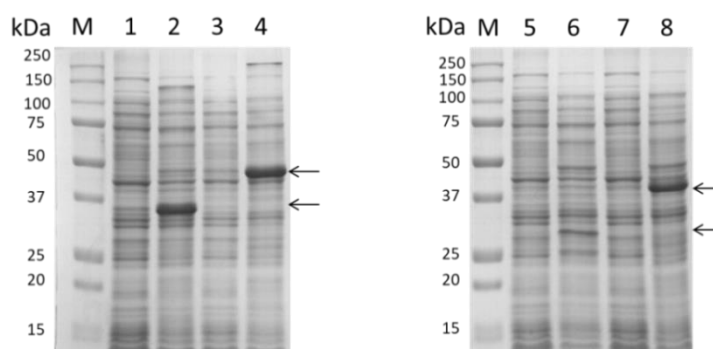
Первые два рекомбинантных белка содержали только пептид M2e, в то время как вторая пара включала как M2e, так и HA2. Поскольку увеличение количества копий пептидов M2e в рекомбинантном белке усиливает иммунный ответ против M2e (Ravin *et al.*, 2015), мы включили четыре тандемные копии M2e. Пептид HA2 также был включен в двух копиях с целью повышения его иммуногенности. Компьютерные модели белков с SAP

пептидом представлены на рисунке 5. Все гены рекомбинантных белков были получены с использованием методов генетической инженерии и клонированы в вектор pQE30.



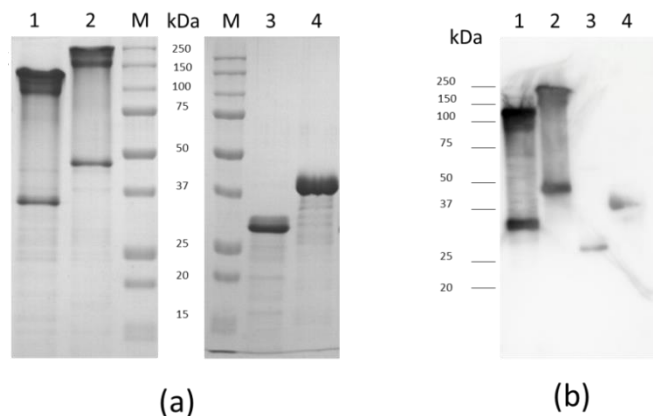
**Рисунок 5.** Наночастицы на основе самособирающегося пептида. (а) Сборка частиц 19s-SAP-Sp-4M2eh; (б) Сборка частиц 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh. 3D-модель мономера и сборка наночастиц. Получена с помощью программы AlphaFold v2.3.1, визуализация PyMOL.

Полученными экспрессионными векторами трансформировали *E. coli* DLT1270. Экспрессию рекомбинантных белков анализировали с помощью SDS-PAGE (Рис. 6).



**Рисунок 6.** Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*. М — маркер молекулярной массы (в kDa); 1, 3, 5, 7 - белковые препараты из культур до индукции; 2 - белковый препарат из штамма pQE30 19S-SAP-Sp-4M2eh после индукции; 4 - белковый препарат штамма pQE30 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh после индукции; 6- белковый препарат из штамма pQE30 19S-Sp-4M2eh после индукции; 8 - белковый препарат из штамма pQE30 19S-Sp-2HA2-4M2eh после индукции. Приведены результаты SDS-PAGE анализа препаратов суммарных белков.

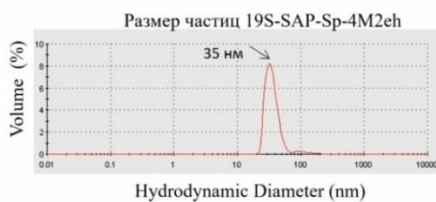
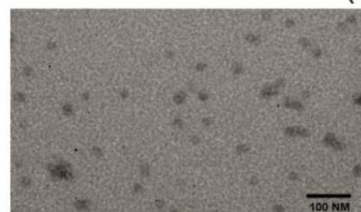
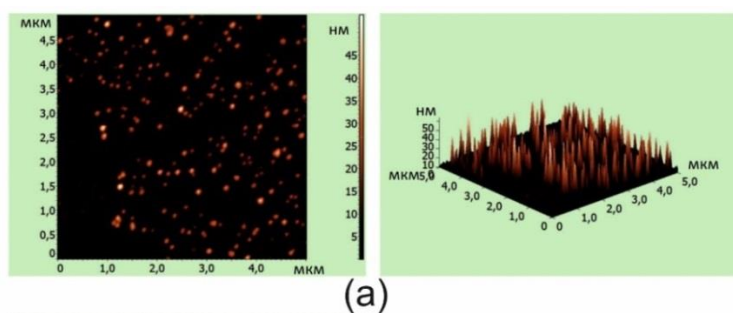
Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях (Рис. 7). Белки также идентифицировали с помощью метода вестерн-блоттинга с использованием антител против M2e (Рис. 7). В SDS-PAGE рекомбинантные белки с SAP представлены в виде трех полос, одна из которых по размеру соответствует мономеру, а другие две - тримеру и пентамеру. Белки 19S-Sp-4M2eh, 19S-Sp-2HA2-4M2eh без SAP пептида на SDS-PAGE представлены в виде одной полосы.



**Рисунок 7.** (а) Очистка рекомбинантных белков. SDS-PAGE анализ белков. М — маркер молекулярной массы (в kDa). 1, 2, 3, 4 — очищенные препараты белков 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh и 19S-Sp-2HA2-4M2eh, соответственно.

(б) Вестерн-блот анализ взаимодействия очищенных белков с анти-M2e антителами. 1, 2, 3, 4 — очищенные препараты 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh и 19S-Sp-2HA2-4M2eh соответственно. Положения и размеры (в kDa) маркеров молекулярной массы показаны слева.

После рефолдинга со ступенчатым понижением концентрации мочевины 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. 8, 9).



**Рисунок 8.** Анализ структуры частиц 19S-SAP-Sp-4M2eh с помощью атомно-силовой микроскопии (а), электронной микроскопии (б), анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (с).

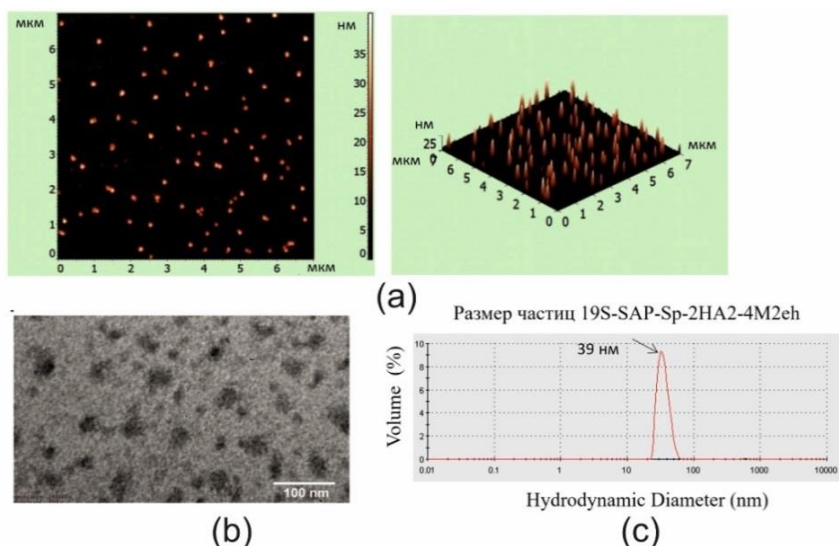


Рисунок 9. Анализ структуры частиц 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh с помощью атомно-силовой микроскопии (а), электронной микроскопии (б), анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (с).

Исследования иммуногенности и протективного действия рекомбинантных белков 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 адъювантов. Контрольной группе вводили PBS. Иммунизация мышей препаратами 19s-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh инициирует образование IgG, специфичных к M2e (Рис. 10).

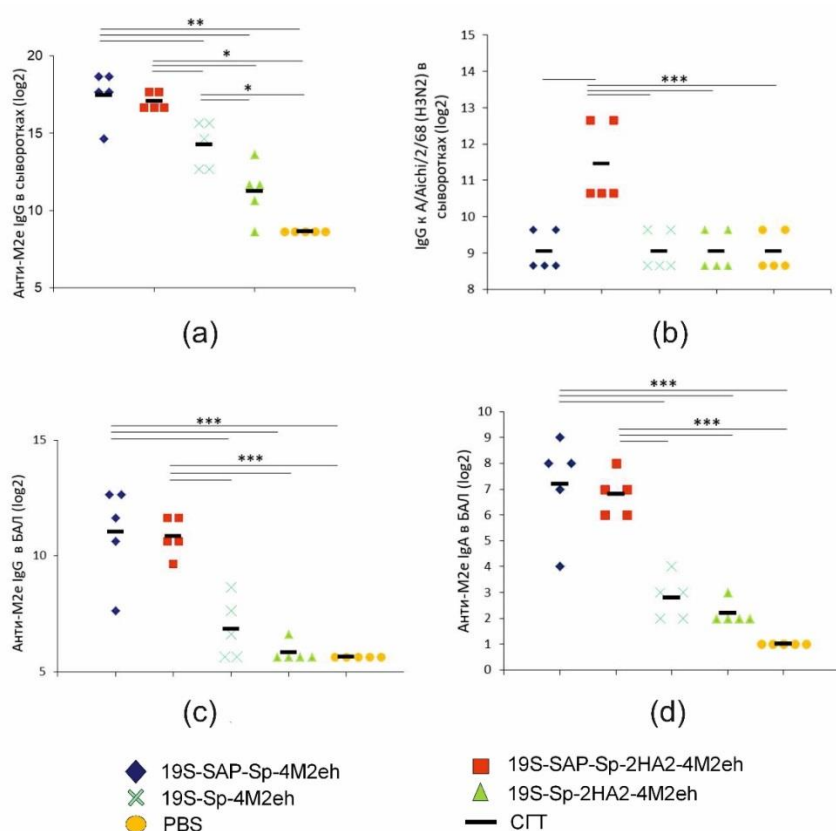
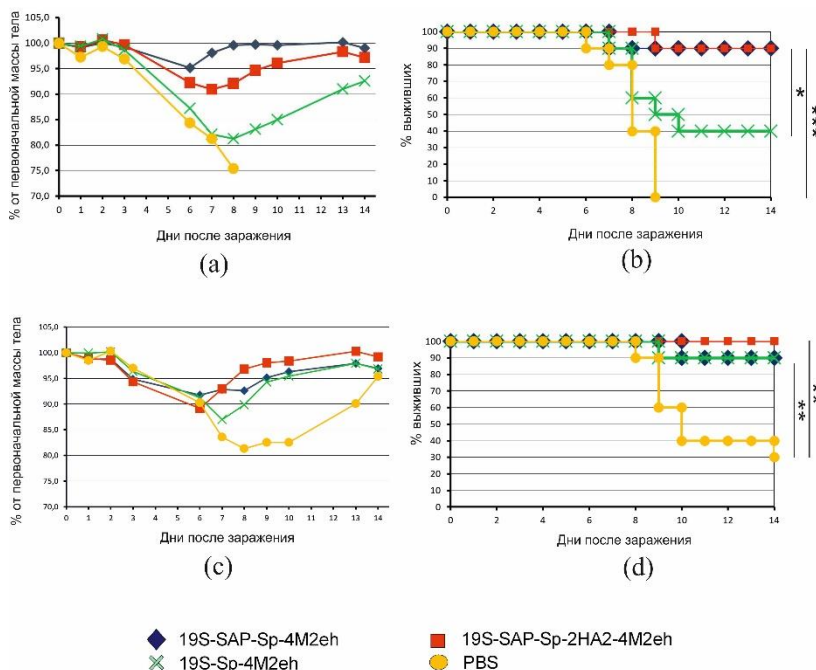


Рисунок 10. Титры антител в сыворотках и в БАЛ после третьей иммунизации мышей Balb/c препаратами 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19S-Sp-4M2eh, 19S-Sp-2HA2-4M2eh. (а) титры анти-M2e IgG в сыворотках крови; (б) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в сыворотках крови; (с) титры анти-M2e IgG в БАЛ; (д) 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 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Титры анти-M2e IgG в сыворотках и в бронхо-альвеолярных лаважах (БАЛ) у мышей, иммунизированных белками с SAP, были значительно выше, чем в группах мышей, иммунизированных контрольными белками без SAP. Та же картина наблюдалась для M2e-специфических иммуноглобулинов типа А (IgA) в БАЛ. Статистически значимых различий 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 не было. 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 без SAP.

Иммунизация рекомбинантным белком 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh индуцировала образование выявляемых в селезенке и легких мышей CD4<sup>+</sup>em клеток памяти – поли- и монопродуцентов цитокинов (IL-2 и TNF; IFN- $\gamma$ ), специфичных к M2e пептиду.

Протективное действие препаратов анализировали по динамике гибели иммунизированных мышей после заражения вирусами гриппа человека A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 10xLD50 или A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4xLD50. Защита на уровне 90-100% наблюдалась у животных, иммунизированных 19S-SAP-Sp-4M2eh и 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (Рис. 11). Препараты белков без SAP обеспечивали более низкий уровень защиты. Защитный эффект рекомбинантных частиц SAP также сопровождается более быстрым восстановлением веса мышей после заражения по сравнению с белками без SAP.



**Рисунок 11.** Динамика массы тела (a, c) и гибели (b, d) мышей Balb/c после заражения вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (a, b) в дозе 10xLD50 и A/Aichi/2/68 (H3N2) (c, d) в дозе 4xLD50. Массу тела и выживаемость контролировали ежедневно в течение 14 дней. Указаны статистически значимые различия между экспериментальными группами (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

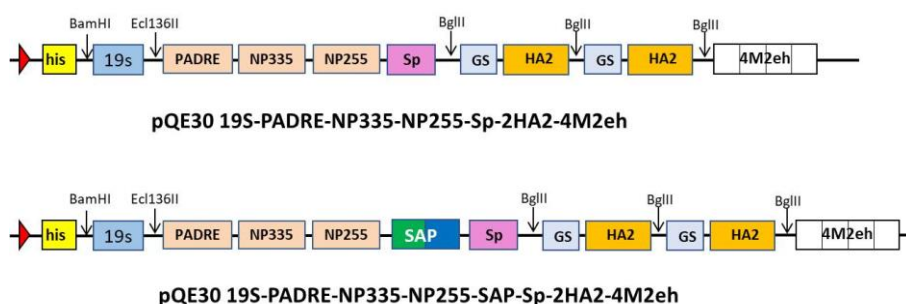
Таким образом, в *E. coli* были получены рекомбинантные белки, содержащие 4 копии консенсусной последовательности M2e пептида вирусов гриппа А человека и HA2 фрагмента гемагглютинина вируса гриппа А/H3N2 (а.о. 76-130) слитых с SAP на С-конце. Включение SAP пептидов в гибридные белки обеспечило их сборку *in vitro* в сферические

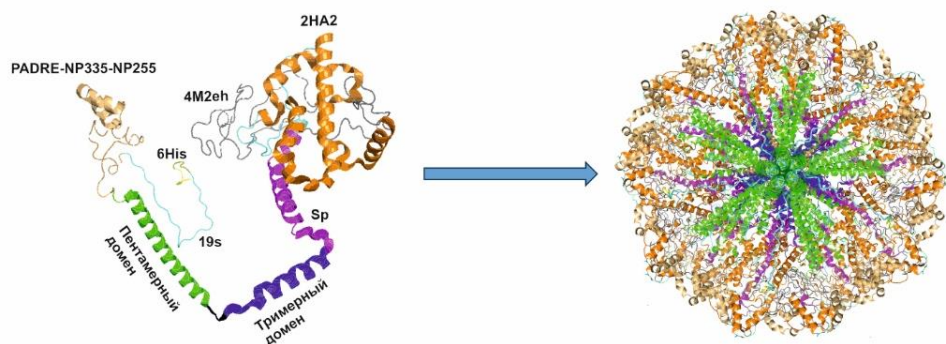
частицы размером 20-50 нм. Интраназальная иммунизация без использования адъювантов SAP частицами, несущими консервативные антигены вируса гриппа А, индуцировала у мышей высокий уровень M2e- и вирус- специфических IgG и IgA и обеспечивала защиту мышей от заражения летальной дозой вируса гриппа А различных субтипов. Интраназальная иммунизация наночастицами 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh индуцировала образование M2e-специфических многофункциональных CD4+ эффекторных Т-клеток памяти. Таким образом, SAP частицы, несущие M2e и HA2 вируса гриппа А, индуцируют гуморальный и Т-клеточный ответ, который способен защитить животных от летальной гриппозной инфекции.

*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 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, содержащие цитотоксические (CTL) эпитопы, были использованы в нескольких пептидных противогриппозных вакцинах (Multimeric-001, FLU-v). Для дополнительной стимуляции Т-клеточного ответа в состав белков был включен Т-хелперный эпитоп PADRE.

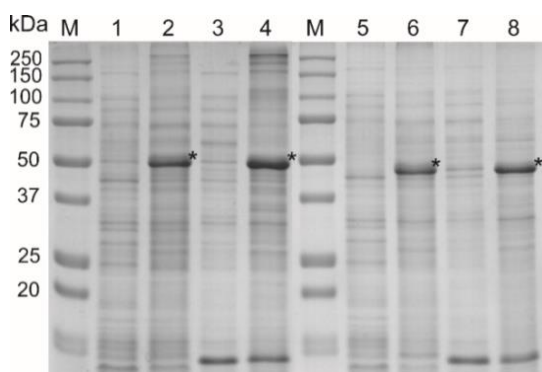
Используемые последовательности целевых пептидов: NP255-275 (DLIFLARSALILRGSVANKS) и NP335-350 (SAAFEDLRVLSFIRGY) – эпитопы из нуклеопротеина, PADRE (AKFVAAWTLKAAA) - универсальный Т-хелперный эпитоп. В белке 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh на N-конце пентамерного домена SAP были размещены два фрагмента нуклеопротеина и эпитоп PADRE, фланкированные дилизиновыми линкерами. На С-конце SAP – 4 копии M2e пептида и 2 копии HA2. Контрольный белок 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh имел аналогичную структуру, но не содержал SAP. Схемы рекомбинантных белков и компьютерная модель структуры белка с SAP показаны на Рис. 12.



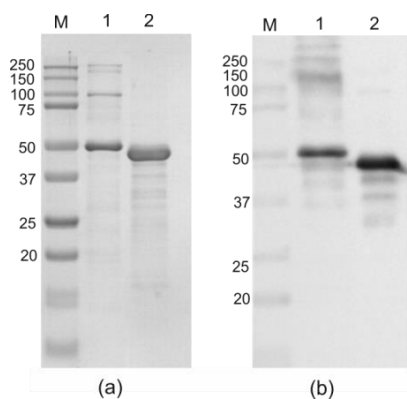


**Рисунок 12.** Структура рекомбинантных белков и частиц 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh. Показана 3D-модель мономера и наночастиц. Структура получена с помощью программы AlphaFold v2.3.1, визуализация PyMOL.

Гены рекомбинантных белков были получены с использованием стандартных методов генетической инженерии и клонированы в вектор pQE30. Рекомбинантные белки были получены в *E. coli* и находились в нерастворимой фракции (Рис. 13). Рекомбинантные белки очищали с помощью никель-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях (Рис. 14). В отличие от контрольного белка без SAP пептида, для белка с SAP пептидом было характерно наличие агрегатов в SDS-PAGE.



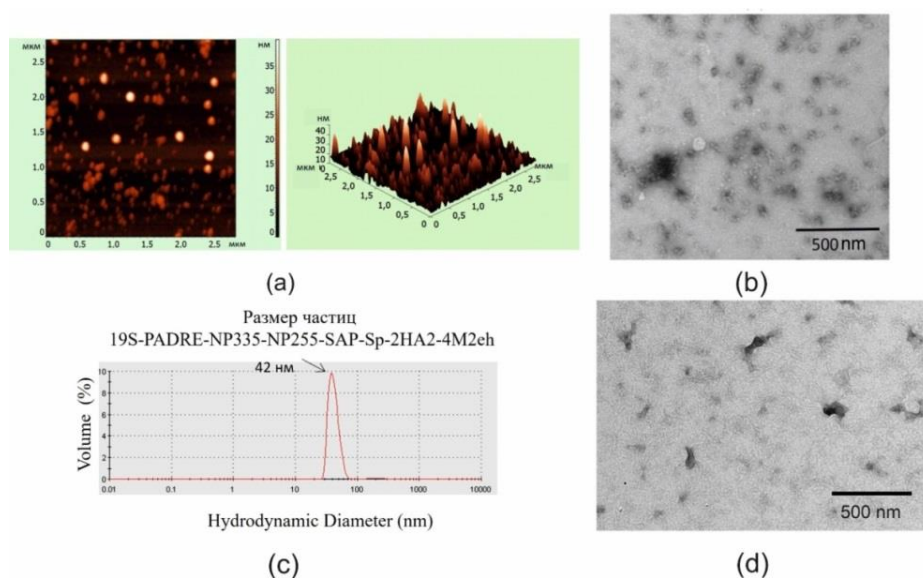
**Рисунок 13.** Индукция рекомбинантных белков в *E. coli* и их растворимость (SDS-PAGE). М — маркер молекулярной массы (kDa); 1, 5 - белковый препарат из неиндуцированных культур штаммов pQE30 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, и pQE30 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh соответственно; 2, 6 - белковый препарат из индуцированных культур штаммов pQE30 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и pQE30 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh; 3, 7 - белки из растворимых фракций; 4, 8 - белки из нерастворимых фракций. Расположение целевых белков отмечено (\*).



**Рисунок 14.** (a) Очистка рекомбинантных белков (SDS-PAGE). 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.



Очищенный в денатурирующих условиях белок 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh подвергали ступенчатому диализу с понижением концентрации мочевины. В процессе рефолдинга этот белок собирается в сферические наночастицы размером от 15 до 35 нм (Рис. 15). Согласно измерениям на Zetasizer NanoS90 гидродинамический диаметр был  $42 \pm 7$  нм. В случае белка без SAP пептида наночастиц обнаружено не было.

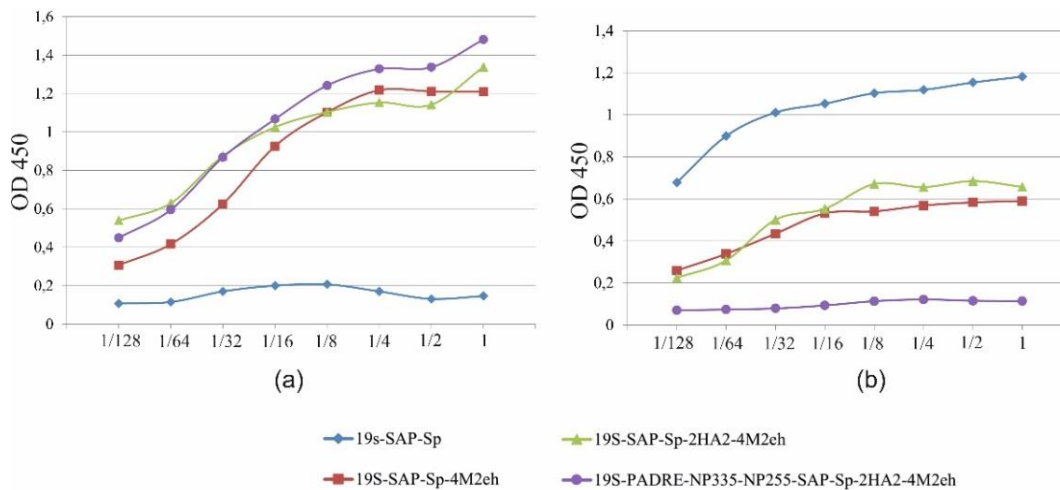


**Рисунок 15.** Анализ структуры частиц 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh с использованием атомно-силовой микроскопии (а), электронной микроскопии (б), анализатора размера частиц Zetasizer NanoS90 (с). Анализ контрольного белка 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh с использованием электронной микроскопии (д).

Для 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. Все препараты с M2e эпитопами взаимодействовали с антителами к M2e (Рис. 16), что свидетельствует о локализации M2e 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. 16), что свидетельствует об эффективном экранировании сформированного SAP пептидом «ядра» наночастицы антигенами вируса гриппа, расположенными на ее поверхности.

Для оценки иммуногенности и протективного действия препаратов группы опытных мышей (линия Balb/c, по 10-14 мышей в каждой группе) были иммунизированы подкожно с двухнедельными интервалами препаратами рекомбинантных белков в дозе 50 мкг/мышь с адьювантом дезоксирибонуклеата натрия (Деринат, 1 мг).



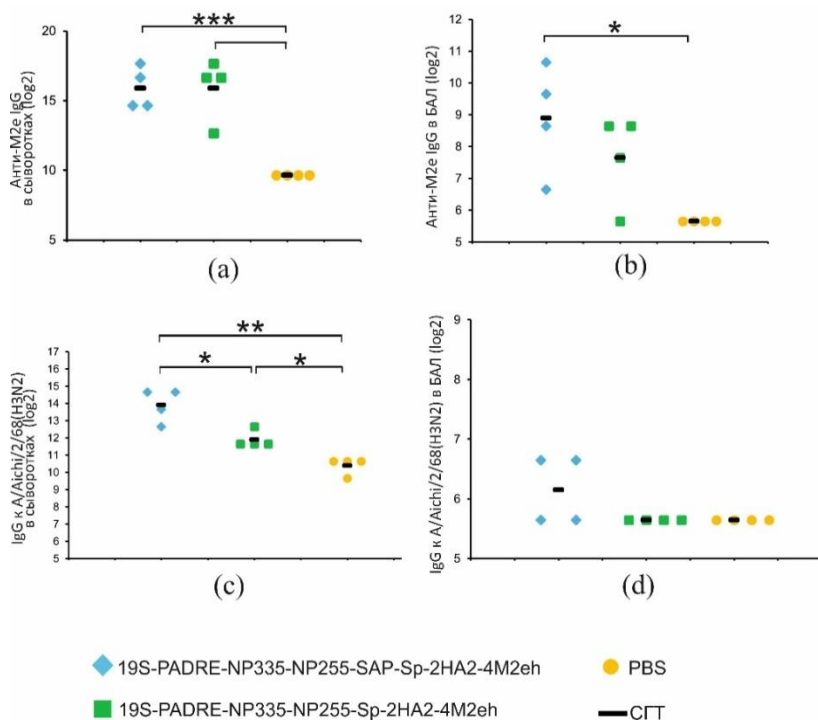
**Рисунок 16.** Антигенные свойства рекомбинантных наночастиц. (а) Двукратные разведения рекомбинантных белков 19S-SAP-Sp, 19S-SAP-Sp-4M2eh, 19S-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh (начиная с 40 мкг/мл) наносили на планшеты, которые затем инкубировали с антителами против M2e. (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.

Для белков 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh (контроль без SAP пептида) не наблюдалось достоверных различий в титрах анти-M2e IgG в сыворотках крови (Рис. 17а). Контрольный белок без SAP содержал четыре тандемные копии M2e. Вероятно, иммуногенность M2e увеличилась за счет того, что он был включен в длинный полипептид. Титры анти-M2e IgG в БАЛ были достоверно выше у мышей, иммунизированных SAP-содержащими частицами, чем у мышей, иммунизированных белком, не содержащим SAP (Рис. 17b). Титры IgG к вирусу A/Aichi/2/68 (H3N2) были выше в сыворотках мышей, иммунизированных белком с SAP (Рис. 17с).

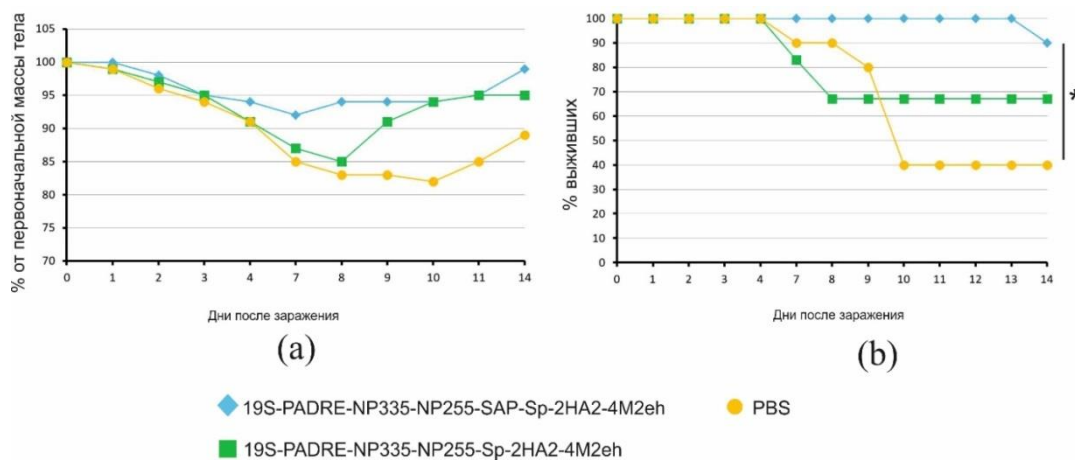
Иммунизация мышей C57BL/6 (B6, H2b) наночастицами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh индуцировала образование M2e-специфичных и вирус-специфических эффекторных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (Тem), выявляемых в селезенках, в то время как доли NP-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Tem-клеток были близки в экспериментальной и контрольной группах. Также было обнаружено появление вирус-специфических полифункциональных CD8<sup>+</sup> Tem-клеток, экспрессирующих CD107a и IFN-γ<sup>+</sup>.

Для оценки протективного действия рекомбинантных белков иммунизированных и контрольных мышей заражали вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4LD50. Мыши, иммунизированные наночастицами 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh, показали 90% выживаемость и минимальную потерю массы тела. 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 (Рис. 18).



**Рисунок 17.** Титры антител в сыворотках и в БАЛ после третьей иммунизации мышей. (а) титры анти-M2e IgG в сыворотках крови; (б) титры анти-M2e IgG в БАЛ; (с) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в сыворотках крови; (д) титры IgG к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в БАЛ. Данные представлены в виде СГТ и значений у отдельных мышей. Указаны статистически значимые различия между группами (\*\*\*)  $0.0001 < p < 0.001$ , \*\*  $0.001 < p < 0.01$ , \*  $0.01 < p < 0.05$ ).



**Рисунок 18.** Динамика массы тела и гибели мышей после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4xLD50. Указаны значения  $p$  между группами (\*  $0.01 < p < 0.05$ ).

Таким образом, получены наночастицы на основе пептида SAP, несущих консервативные участки гемагглютинина, нуклеопротеина и M2e, а также универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцировала гуморальный иммунный ответ против M2e и вируса гриппа A/H3N2 и приводила к образованию секретирующих цитокины антиген-специфичных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток памяти. Наночастицы на основе SAP обладают высокой иммуногенностью и обеспечивают защиту мышей от летальной гриппозной инфекции.

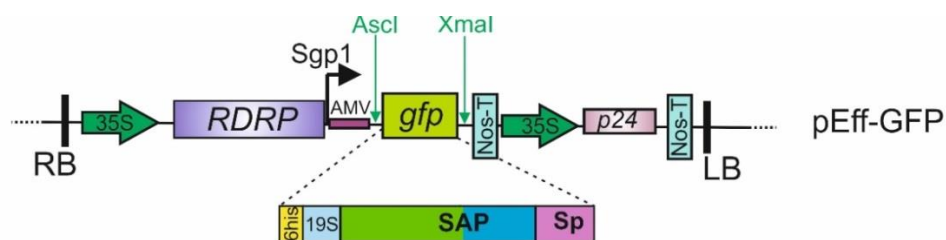
## 2. Получение наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, с использованием растительной системы экспрессии.

Для получения рекомбинантных белков можно использовать растительные системы экспрессии, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с другими системами. Например, они предполагают более низкие производственные затраты, чем использование культур клеток животных, возможность масштабирования процессов, а также безопасность продукта, поскольку растения и человек не имеют общих патогенов (Horn *et al.*, 2004).

Целью этой части работы было получение в растениях наночастиц на основе SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа А. Для экспрессии рекомбинантных белков в растениях *Nicotiana bethamiana* использовали самореплицирующийся вирусный вектор pEff (Mardanova *et al.*, 2017).

### 2.1. Получение наночастиц на основе SAP пептида

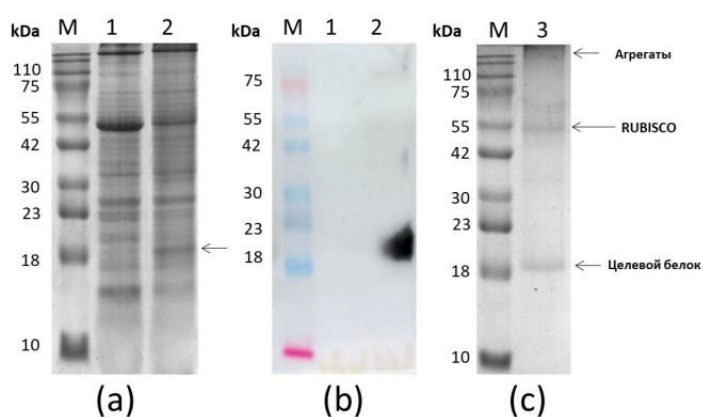
Ген, кодирующий 19S-SAP-Sp, был клонирован в вектор pEff (Рис. 19). Полученный вектор pEff 19s-SAP-Sp переносили в штамм *A. tumefaciens* GV3101 и, используя метод агроинфильтрации, вводили в листья *N. benthamiana*.



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

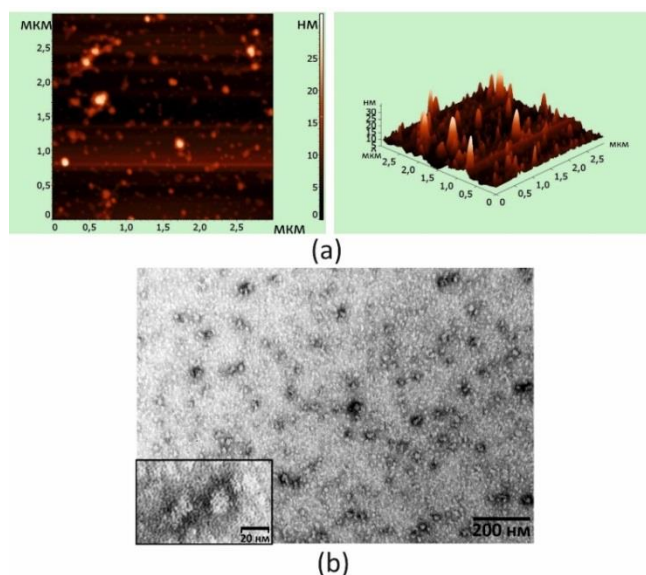
RDRP - ген РНК-зависимой РНК-полимеразы; Sgp1 - первый промотор субгеномной РНК PVX; AMV - трансляционный энхансер вируса мозаики люцерны; 35S - промотор РНК вируса мозаики цветной капусты; Nos-T - терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; P24 - ген супрессора сайленсинга; his - гексагистидиновая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

Для контроля синтеза целевого белка фрагменты листа собирали на 1, 2, 3, 4 день после инфильтрации. Через 3-4 дня после инфильтрации в зонах инфильтрации наблюдался некроз. SDS-PAGE анализ образцов белка из агроинфильтрованных листьев и вестерн-блоттинг (Рис. 20) показали, что 19S-SAP-Sp синтезировался в растительных клетках на уровне около 100 мкг/г ткани листа. Очистку 19S-SAP-Sp проводили в денатурирующих условиях с помощью металл-аффинной хроматографии. После очистки образцы белка подвергали поэтапному диализу против PBS с понижением концентрации мочевины. Выход белка составлял около 40 мкг/г ткани листа (Рис. 20).



**Рисунок 20.** Продукция белка 19S-SAP-Sp в растениях *N. benthamiana*. SDS-PAGE (a), (c) и Вестерн-блот (b) с антителами против SAP. М, маркер молекулярной массы (kDa); 1, экстракт белков, выделенных из неинфильтрированного листа; 2, экстракт белков, выделенных из листа, инфильтрированного рEff 19S-SAP-Sp; 3, очищенный белок 19S-SAP-Sp. Положение белка 19S-SAP-Sp показано стрелкой.

С помощью атомно-силовой микроскопии и электронной микроскопии показано, что полученный в растениях белок 19S-SAP-Sp образует частицы размером 15-25 нм (Рис. 21).

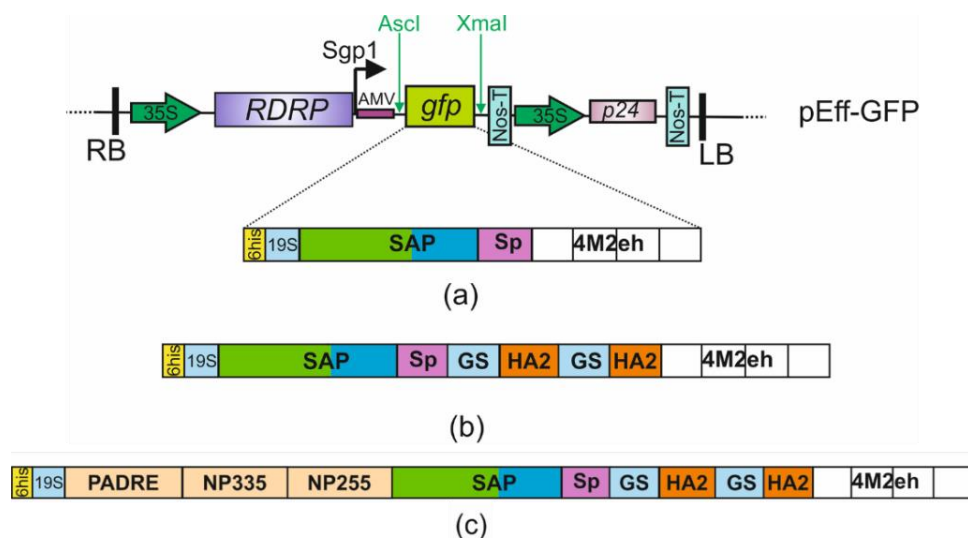


**Рисунок 21.** Анализ наночастиц, образованных белком 19S-SAP-Sp, полученным в растениях, методами атомно-силовой микроскопии (a) и электронной микроскопии (b).

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

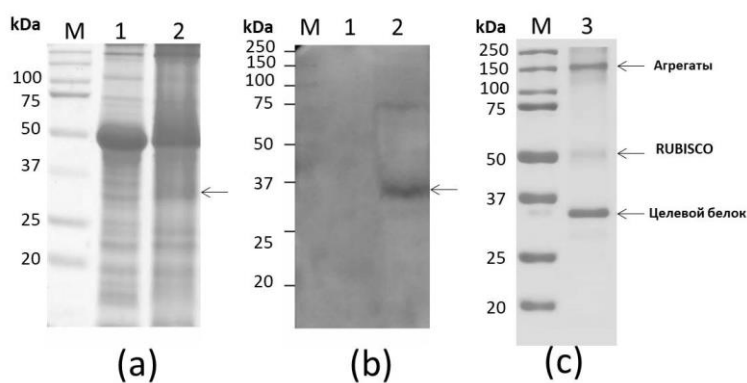
Гены 19s-SAP-Sp-4M2eh, 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh клонировали в вектор рEff (Рис. 22). Полученные векторы вводили в штамм *A. tumefaciens* GV3101. Для экспрессии в растениях листья *N. benthamiana* были инфильтрированы агробактериями, несущими рекомбинантные экспрессионные векторы.

Белок 19S-SAP-Sp-4M2eh синтезировался на уровне около 80-100 мкг/г биомассы свежих листьев, а выход после очистки составлял около 60 мкг/г (Рис. 23). Для белков 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-2HA2-4M2eh уровень экспрессии был менее 20 мкг/г ткани листа. По-видимому, эти белки токсичны для растений, поскольку уже на второй день после инфильтрации наблюдался сильный некроз ткани листа.



**Рисунок 22.** 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; his - гексагистидиновая последовательность; 19S- гибкий линкер, богатый глицином; SAP - самособирающийся пептид; Sp - спиральный линкер; 4M2eh - четыре копии M2e; GS - короткий глициновый линкер; HA2 - последовательность участка второй субъединицы гемагглютинаина; PADRE – Т хелперный эпитоп PADRE; NP335 и NP-255 – эпитопы нуклеопротеина; RB и LB, правая и левая границы области Т-ДНК.

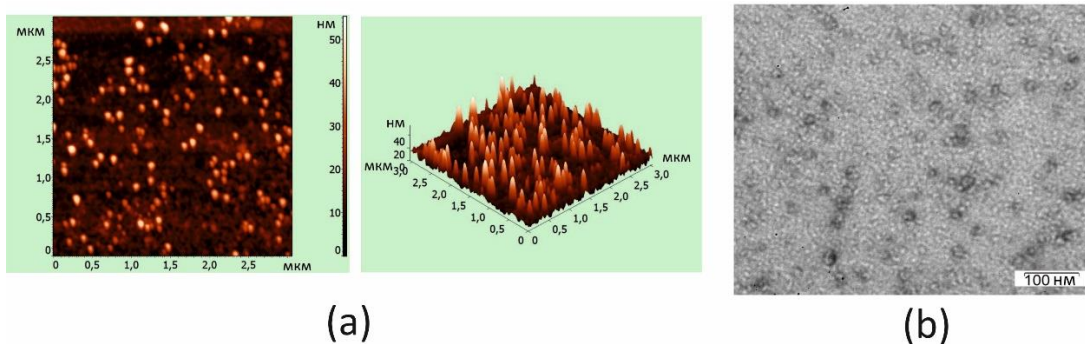


**Рисунок 23.** Продукция белка 19S-SAP-Sp-4M2eh в растениях *N. benthamiana*.

SDS-PAGE (a), (c) и Вестерн-блот (b) с антителами против M2e. М, маркер молекулярной массы (kDa); 1, экстракт белков, выделенных из неинфильтрированного листа; 2, экстракт белков, выделенных из листа, инфильтрированного pEff 19S-SAP-Sp-4M2eh; 3, очищенный белок 19S-SAP-Sp-4M2eh.

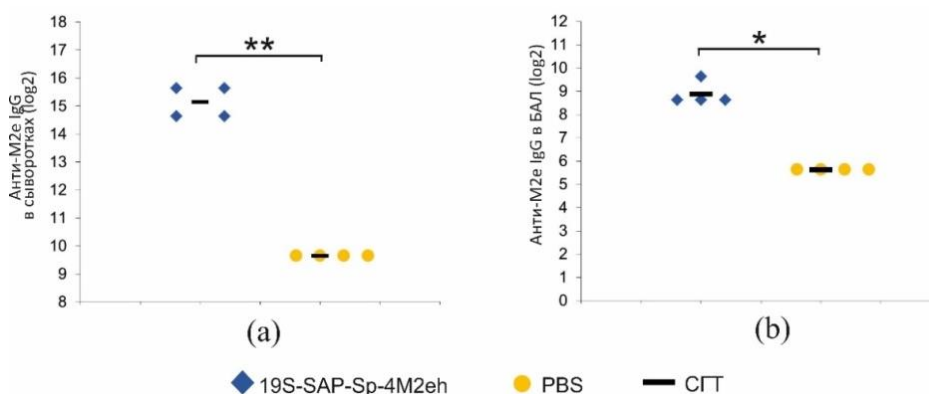
Положение белка 19S-SAP-Sp-4M2eh показано стрелкой.

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 (Рис. 24).



**Рисунок 24.** Анализ частиц, образованных белком 19S-SAP-Sp-4M2eh, методами атомно-силовой микроскопии (a) и электронной микроскопии (b).

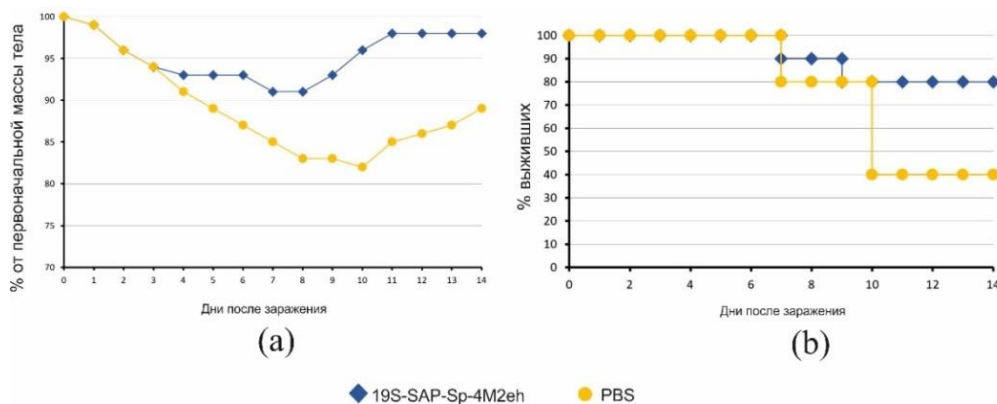
Для характеристики иммуногенности и протективного действия белка 19S-SAP-Sp-4M2eh, полученного в растительной системе экспрессии, мышей (линия Balb/c, по 10-14 на группу) иммунизировали подкожно с двухнедельными интервалами в дозе 50 мкг/мышь с адьювантом дезоксирибонуклеата натрия (Деринат, 1 мг). Иммунизация мышей наночастицами 19S-SAP-Sp-4M2eh индуцировала высокие уровни антител IgG против M2e как в сыворотках крови, так и в БАЛ (Рис. 25).



**Рисунок 25.** Титры антител в сыворотках и в БАЛ после третьей иммунизации мышей препаратом 19S-SAP-Sp-4M2eh, полученным в растениях (a) титры анти-M2e IgG в сыворотках крови; (b) титры анти-M2e IgG в БАЛ. Данные представлены в виде средних геометрических титров (СГТ) и значений, наблюдаемых у отдельных мышей. Указаны статистически значимые различия между 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. 26). Иммунизация мышей «растительными» наночастицами 19S-SAP-Sp-4M2eh обеспечивала 80% защиту от заражения вирусом при 40% выживаемости в контроле. Максимальная потеря веса у иммунизированной группы составила 9%, в то время как выжившие мыши в контрольной группе потеряли до 17% веса и восстанавливались медленнее. Близкие показатели выживаемости (90%) были зарегистрированы у мышей, которые были

иммунизированы полученным в *E. coli* препаратом 19s-SAP-Sp-4M2eh. Таким образом, наночастицы на основе SAP, содержащие M2e, полученные в бактериальной и растительной системах экспрессии, обладают сходными характеристиками.



**Рисунок 26.** Изменение массы тела (а) и выживаемость (б) иммунизированных и контрольных мышей после заражения 4xLD50 вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 частицами индуцировала высокие уровни M2e-специфических антител и обеспечивала защиту от 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: M2e пептид, фрагмент второй субъединицы гемагглютинина (HA2) 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 M2e и HA2, индуцировала гуморальный иммунный ответ против M2e 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 M2e пептид, после рефолдинга *in vitro* образует наноразмерные частицы. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцирует гуморальный ответ против M2e 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. ИФ<sub>2023</sub> 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. ИФ<sub>2023</sub> 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. ИФ<sub>2023</sub> WoS 4,0. Доля участия 40%. 0.6 п. л.