

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Грановский Дмитрий Львович

**Создание и характеристика кандидатной вакцины против
сибирской язвы на основе структурно модифицированных
вирусов растений**

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация выполнена на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители

– Карпова Ольга Вячеславовна, доктор биологических наук, профессор

Рябчевская Екатерина Михайловна, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты

– Калинина Наталья Олеговна, доктор биологических наук, профессор. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ведущий научный сотрудник отдела биохимии вирусов растений

Гамбарян Александра Сергеевна, доктор биологических наук. ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии вирусов

Марданова Евгения Сергеевна, доктор биологических наук. ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования

Защита диссертации состоится «05» июня 2025 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.015.4.dissovet@org.msu.ru

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/015.4/3393>

Автореферат разослан «__» апреля 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Сибирская язва – тяжёлое инфекционное заболевание бактериальной природы. Споры возбудителя сибирской язвы, грамположительной бактерии *Bacillus anthracis*, способны в течение десятилетий персистировать в почве с сохранением вирулентных свойств. Формирование почвенных резервуаров *B. anthracis* является основной причиной вспышек заболевания как среди сельскохозяйственных и диких животных, так и у человека. Случаи возникновения заболевания у человека регистрируются по всему земному шару ежегодно. Согласно отчётам, в 2023 году в Российской Федерации сибирская язва была обнаружена у 19 человек, а в странах ближнего зарубежья – у 137 (Рязанова *и др.*, 2024). В дополнение к природным вспышкам заболевания важно отметить, что споры *B. anthracis* могут использоваться в качестве инфекционного агента при биотеррористических актах. Прецедент произошёл в 2001 году в США: злоумышленники рассылали споры возбудителя в почтовых отправлениях (Jernigan *et al.*, 2001). Таким образом, создание современных и эффективных методов борьбы с заболеванием крайне актуально.

Существуют два вида лицензированных вакцин для профилактики сибирской язвы: живые аттенуированные вакцины и препараты, основанные на бесклеточных фильтрах культур *B. anthracis*. Живые аттенуированные вакцины применяются для вакцинации человека только в России и в Китае. Их основным недостатком является невозможность использования одновременно с терапией антибиотиками. Вакцины, основанные на фильтрах бесклеточных культур возбудителя сибирской язвы, адсорбированных на алюмосодержащих носителях, лицензированы в США (BioThraxTM и CYPHENDUSTM) и Великобритании (AVP – Anthrax Vaccine Precipitated, вакцина против сибирской язвы преципитированная). Основным белком-иммуногеном в этих препаратах является один из трёх компонентов токсина сибирской язвы, протективный антиген *B. anthracis* – PA (protective antigen, молекулярная масса – 83 кДа). PA безопасен для человека в отсутствие остальных компонентов токсина, антител к нему достаточно для формирования эффективного протективного иммунного ответа (Taft, Weiss, 2008). Однако данные вакцины содержат большое количество примесей *B. anthracis*, что приводит к высокой реактогенности препарата. Также известно, что PA обладает низкой стабильностью, а хранение в присутствии геля гидроксида алюминия приводит к его ускоренной деградации и изменению антигенных свойств (Wagner *et al.*, 2012; D'Souza *et al.*, 2013). В связи с этим необходимость разработки стабильной и безопасной вакцины нового поколения не вызывает сомнений.

Современные разработки вакцин против сибирской язвы, как правило, предлагают в качестве основного компонента препарата рекомбинантный PA (rPA). Использование именно рекомбинантного белка позволяет обеспечить строго детерминированный состав вакцины, а также вносить изменения в аминокислотную последовательность антигена. Наиболее распространённым подходом является создание субъединичных вакцин, в которых rPA представлен в комбинации с платформой-носителем или адъювантом. Именно полноразмерный rPA (rPA83) при иммунизации способен обеспечить формирование наиболее эффективного протективного иммунного ответа (Abbound, Casadevall, 2008). При этом основной проблемой субъединичных вакцин против сибирской язвы на основе rPA83 является нестабильность данного антигена вследствие протеолиза и спонтанного дезаминирования отдельных остатков аспарагина. В попытке решить эту проблему были

разработаны варианты модифицированного rPA83 со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза (Singh *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2002) или дезаминирования (Verma *et al.*, 2018). Оба варианта замен привели к увеличению стабильности белка, однако возможность их комбинации не была исследована.

В качестве носителя, адьюванта или стабилизатора для rPA применяются вещества и частицы различной природы, например, гель гидроксида алюминия (Campbell *et al.*, 2007), полисахариды (Feinen *et al.*, 2014; Bento *et al.*, 2015), водно-масляные эмульсии (Bielinska *et al.*, 2007), вирусы бактерий (Shivachandra *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2011; Peachman *et al.*, 2012) или животных (Yin *et al.*, 2008). Потенциал вирусов растений в качестве носителя и стабилизатора для rPA на данный момент не изучен. Большинство используемых адьювантов обладают существенными недостатками, такими как дестабилизация rPA при хранении, высокая реактогенность, сложность изготовления. Оптимальная платформа для rPA, не оказывающая негативного влияния на его стабильность и иммуногенность, полностью безопасная для человека и экономически выгодная, пока неопределена.

Таким образом, разработка субъединичной вакцины против сибирской язвы, содержащей rPA в качестве основного белка-антигена, определение наиболее эффективного подхода к стабилизации rPA в составе такой вакцины, а также выбор подходящей платформы-носителя – актуальные задачи современной науки. Их решение позволит обеспечить более эффективную защиту населения и сельскохозяйственных животных от такого тяжелого и опасного заболевания, как сибирская язва.

Цель и задачи исследования

Цель исследования заключалась в разработке, получении и характеристике стабильного рекомбинантного субъединичного вакцинного кандидата против сибирской язвы на основе структурно модифицированных вирусов растений.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Разработать и получить модифицированный рекомбинантный протективный антиген *Bacillus anthracis* (PA – protective antigen) со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза и дезаминирования и изучить его антигенную специфичность.
- 2) Оценить стабильность полученного антигена в сравнении с немодифицированным рекомбинантным PA (rPA).
- 3) Создать вакцинный кандидат – композицию полученного антигена со сферическими частицами (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ). Исследовать возможность стабилизации полученного антигена с помощью СЧ ВТМ и его антигенную специфичность в составе вакцинного кандидата.
- 4) Исследовать иммуногенность модифицированного rPA в виде свободного белка и в составе вакцинного кандидата на морских свинках.
- 5) Изучить на морских свинках протективность вакцинного кандидата против полностью вирулентного штамма *B. anthracis*.
- 6) Разработать и получить два двухдоменных рекомбинантных антигена, содержащих домены I и II или домены III и IV PA со стабилизирующими заменами и изучить их антигенную специфичность и стабильность в композиции с СЧ ВТМ.
- 7) Исследовать возможность получения вакцинного кандидата, содержащего СЧ ВТМ и два двухдоменных антигена (I+II и III+IV) одновременно.

Объект исследования

Объектами исследования являлись рекомбинантные белки, представляющие собой полноразмерный протективный антиген сибирской язвы или его двухдоменные фрагменты со стабилизирующими аминокислотными заменами, а также их композиции с СЧ ВТМ.

Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые получены и охарактеризованы три оригинальных рекомбинантных антигена: rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m. Полученные антигены представляют собой полноразмерный модифицированный рекомбинантный протективный антиген *B. anthracis*, домены I и II PA или домены III и IV PA, соответственно, со стабилизирующими аминокислотными заменами. В последовательностях антигенов rPA83m и rPA(1+2)m впервые одновременно применены замены в фурин- и химотрипсин-чувствительных сайтах протеолиза, а также замены аминокислотных остатков аспарагина, подверженных спонтанному дезаминированию, на глутамин. Все три полученных оригинальных антигена взаимодействовали с поликлональной сывороткой к рекомбинантному PA (rPA), при этом rPA83m и rPA(3+4)m также взаимодействовали с моноклональными нейтрализующими антителами к домену IV PA.

Впервые продемонстрировано увеличение стабильности rPA в присутствии СЧ ВТМ. Были получены и охарактеризованы композиции rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ. Таким образом, впервые показана возможность адсорбции рекомбинантного антигена бактериальной природы на поверхности структурно модифицированных частиц вируса растений. При этом впервые была показана стабилизация и сохранение антигенных свойств rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m в составе композиций с модифицированными частицами вирусов растений даже после инкубации в течение 40 дней при +37 °С. Также впервые показана возможность создания композиции, в которой на поверхности СЧ ВТМ одновременно адсорбированы два двухдоменных антигена бактериальной природы: rPA(1+2)m и rPA(3+4)m.

Вакцинный кандидат – композиция rPA83m+СЧ ВТМ – является иммуногенным и обеспечивает протективный эффект на морских свинках. Впервые продемонстрировано, что иммунизация модифицированным стабилизированным rPA в композиции с СЧ ВТМ обеспечивает стопроцентную защиту морских свинок от заражения полностью вирулентным штаммом *B. anthracis*. При этом протективные свойства вакцинного кандидата значимо не ослабевают в результате его предварительной инкубации в течение 27 дней при +37 °С (условия искусственного “состаривания” препарата).

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют считать композицию rPA83m с СЧ ВТМ, а также композицию двух двухдоменных антигенов rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ перспективными вакцинными кандидатами против сибирской язвы. Стабилизация антигенов, которая была достигнута путём внесения аминокислотных замен в сайтах протеолиза и спонтанного дезаминирования, а также формированием композиции с СЧ ВТМ, обеспечивает возможность длительного хранения вакцинных кандидатов без изменения их антигенных свойств даже при нарушении холодной цепи. Полученные композиции являются субъединичными рекомбинантными вакцинами, что позволяет применять их совместно с терапией антибиотиками. Последнее критически важно для

профилактики сибирской язвы во время вспышек инфекции не только у человека, но и у сельскохозяйственных животных.

Полученные результаты представляют научный интерес для специалистов в области вирусологии, микробиологии и вакцинологии. Они открывают новые перспективы для создания стабильных вакцин против сибирской язвы с использованием носителей-стабилизаторов вирусной природы. Полученные данные о новом подходе для создания вакцин (адсорбции антигена бактериальной природы на частицах вирусов растений) будут использованы при чтении лекций вирусологии в МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в работе с научной литературой, планировании и проведении экспериментальной части исследования, обработке и интерпретации полученных результатов. Автор внёс вклад в подготовку научных публикаций по материалам диссертационной работы и представлял результаты исследований на всероссийских и международных конференциях. Имена соавторов указаны в опубликованных работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Автором написаны текст диссертации и автореферат к ней. Вклад автора в представленную работу определяющий.

Методы и методология научного исследования

В исследовании были применены современные методы генетической инженерии, биохимии, молекулярной биологии, вирусологии, иммунохимии, микроскопии, методы работы с культурами клеток и с лабораторными животными, биоинформатические и статистические подходы. Используемые методы подробно описаны в соответствующем разделе текста диссертации.

Положения, выносимые на защиту

1) Рекомбинантные антигены, представляющие собой полноразмерный протективный антиген (РА) *Bacillus anthracis* (rPA83m) или его двухдоменные фрагменты (rPA(1+2)m и rPA(3+4)m), модифицированные путём внесения стабилизирующих аминокислотных замен, могут быть использованы в составе вакцинного кандидата против сибирской язвы.

2) Антигенная специфичность полученных белков rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m соответствует немодифицированному РА.

3) Аминокислотные замены, внесённые в последовательность rPA83m, повышают стабильность белка.

4) Сферические частицы (СЧ), полученные в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ), способны стабилизировать rPA83m, rPA(1+2)m и rPA(3+4)m, не изменяя при этом антигенную специфичность данных белков.

5) Как свободный антиген rPA83m, так и вакцинный кандидат rPA83m+СЧ ВТМ индуцируют выработку высокого титра антител к rPA83m. Длительная инкубация обоих препаратов при +37 °С не приводит к уменьшению их иммуногенности.

6) Вакцинный кандидат rPA83m+СЧ ВТМ способен обеспечить стопроцентную защиту морских свинок от инфекции полностью вирулентным штаммом сибирской язвы, при этом протективность вакцинного кандидата значимо не снижается в результате инкубации +37 °С в течение 27 дней.

Степень достоверности и результаты апробации

Результаты были получены с применением актуальных методик и современного научного оборудования. Данные, полученные в экспериментальной части работы, были обработаны с использованием современного программного обеспечения и методов статистического анализа. Результаты, представленные в настоящей работе, опираются на экспериментальные данные, а также на результаты исследований, опубликованных в рецензируемых научных журналах.

По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – Вирусология. Также по теме диссертационной работы получено 2 патента РФ. Результаты диссертационной работы были представлены на XI Международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни” (Москва, 2019), на 26-й и 28-й Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов” (Москва, 2019, 2021), на международном конгрессе “The 44th FEBS Congress” (Краков, Польша, 2019), на III Объединенном научном форуме, включающем VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), на международном форуме “Биотехнология: состояние и перспективы развития” (Москва, 2020), на международном конгрессе “IUBMB–FEBS–РАВМВ Congress” (Лиссабон, Португалия, 2022), на III Объединенном Научном Форуме Физиологов, Биохимиков И Молекулярных Биологов (Сочи, 2022), а также в рамках международной летней научной школы “7th Innovative Approaches for Identification of Antiviral Agents Summer School” (Сардиния, Италия, 2024).

Структура и содержание работы

Диссертационная работа изложена на 159 страницах и состоит из введения, обзора литературы, раздела “Материалы и методы”, раздела “Результаты и обсуждение”, заключения и библиографии. Работа содержит 4 таблицы, 25 рисунков и 8 приложений. Библиография включает 188 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Стабильность рекомбинантного полноразмерного РА

Протективный антиген (protective antigen, РА) – один из трёх белков токсина сибирской язвы, который является основным компонентом при разработке рекомбинантных вакцин против сибирской язвы. Он не токсичен в отсутствие остальных компонентов токсина: фактора отёчности (ЕF) и фактора летальности (LF). При этом наличия антител к РА достаточно для защиты от инфекции (Taft, Weiss, 2008). РА – крупный (735 а. о., 83 кДа) четырёхдоменный белок. Пространственная структура РА, построенная на основании данных из открытой базы PDB (PDB: 1ACC; Petosa *et al.*, 1997; Berman *et al.*, 2000), представлена на **Рисунке 1**.

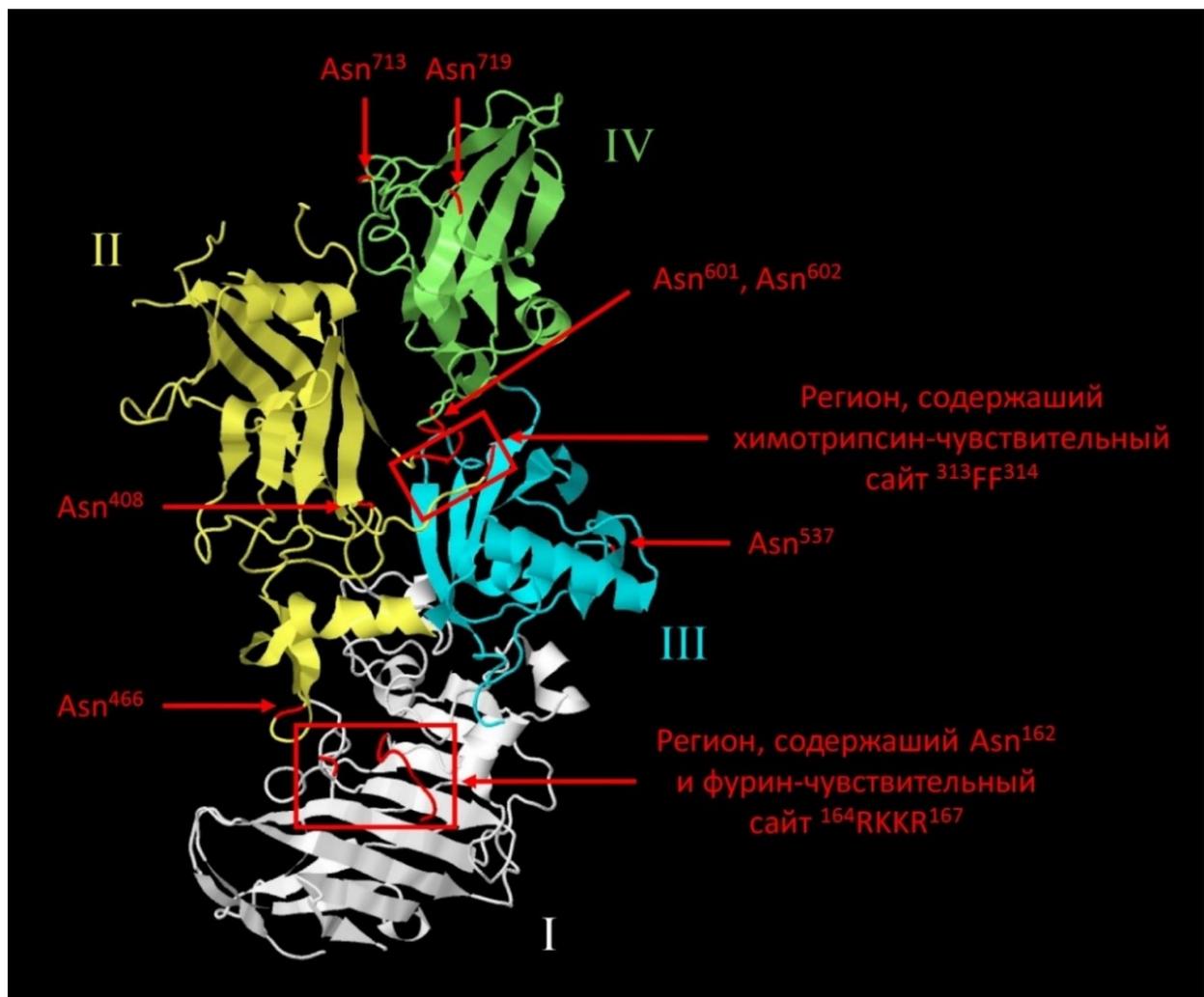


Рисунок 1. Структура протективного антигена сибирской язвы (РА)

Четыре домена (I-IV) выделены белым, желтым, голубым и зелёным, соответственно.

Именно полноразмерный РА (РА83) способен индуцировать формирование наиболее эффективного протективного иммунного ответа (Abbound, Casadevall, 2008). Однако низкая стабильность белка, главным образом связанная с протеолизом и дезаминированием, является основным фактором, лимитирующим возможность создания на его основе эффективной рекомбинантной вакцины. На **Рисунке 1** красным цветом отмечены два сайта протеолиза (фурин-чувствительный сайт $^{164}\text{RKKR}^{167}$ в домене I и химотрипсин-чувствительный сайт $^{313}\text{FF}^{314}$ в домене II) и наиболее подверженные спонтанному дезаминированию остатки аспарагина в составе РА.

На первом этапе работы мы провели оценку стабильности рекомбинантного РА83 (гРА83) путём искусственного “состаривания” белка при +25 °С (**Рисунок 2**). В этом же эксперименте проводилось изучение возможности стабилизации гРА83 путём образования его композиции со сферическими частицами (СЧ), полученными в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ).

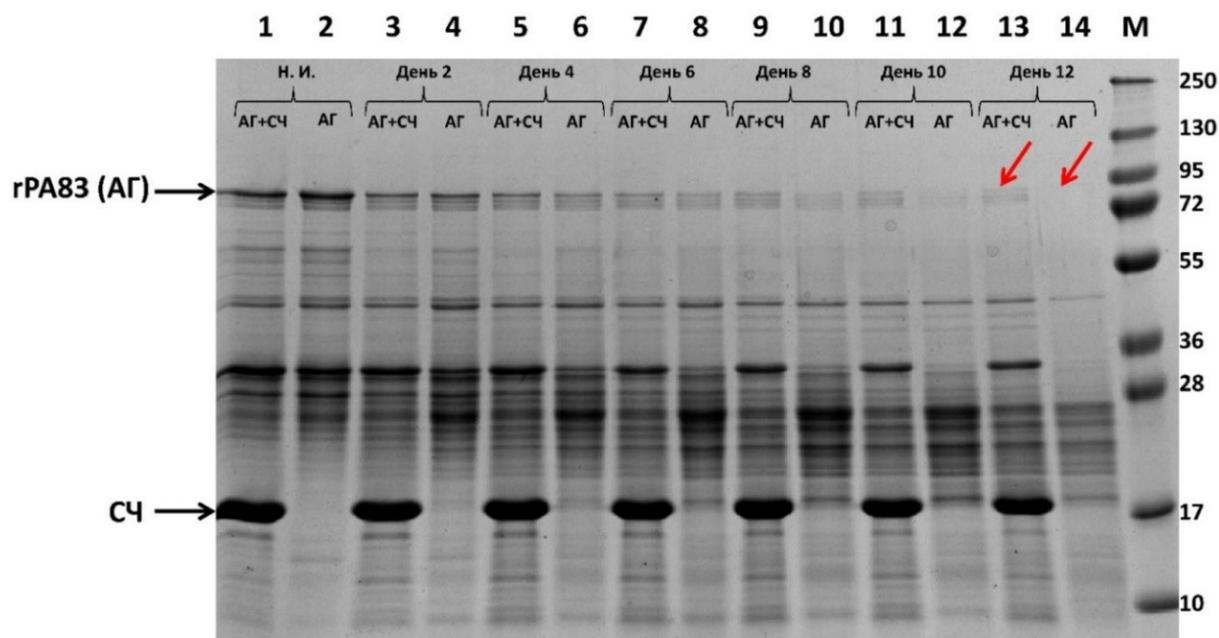


Рисунок 2. СЧ ВТМ стабилизируют рекомбинантный РА (гРА83)

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – композиции гРА83+СЧ. **2, 4, 6, 8, 10, 12, 14** – свободный гРА83. **1, 2** – неинкубированные образцы (Н.И.). **3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14** – образцы, инкубированные при +25 °С в течение 2, 4, 6, 8, 10 или 12 дней, соответственно. **М** – маркеры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа). Красные стрелки указывают на различие в стабильности между свободным гРА83 и гРА83 в композиции с СЧ ВТМ. АГ- антиген - гРА83.

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что СЧ ВТМ безопасны для человека и животных и могут выступать адъювантом для ряда антигенов вирусной природы (Никитин *и др.*, 2011; Karpova *et al.*, 2012; Trifonova *et al.*, 2014; Никитин *и др.*, 2016; Trifonova *et al.*, 2017; Nikitin *et al.*, 2018a,b,c; Evtushenko *et al.*, 2020; Kurashova *et al.*, 2020; Kovalenko *et al.*, 2022). Они обладают высокими адсорбционными свойствами и, возможно, могут играть роль депо антигена (Trifonova *et al.*, 2017). В связи с этим мы выдвинули предположение, что СЧ ВТМ могут увеличивать стабильность гРА83.

Препараты свободного гРА83 и гРА83 в композиции с СЧ ВТМ были инкубированы в течение 12 дней при +25 °С (**Рисунок 2**). На 12-й день эксперимента полоса, соответствующая полноразмерной форме гРА83, всё ещё детектировалась в образце, содержащем СЧ (**Рисунок 2, дорожка 13**), и не определялась методом электрофореза в случае свободного антигена (**Рисунок 2, дорожка 14**), что подтверждает возможность стабилизации гРА83 с помощью СЧ ВТМ.

2. Дизайн и получение модифицированного полноразмерного протективного антигена сибирской язвы гРА83m

В качестве второго подхода к стабилизации гРА83 мы использовали внесение стабилизирующих замен в аминокислотную последовательность белка: фрагмент

$^{164}\text{RKKR}^{167}$ в фурин-чувствительном сайте был заменён на $^{164}\text{SNKE}^{167}$, остатки $^{313}\text{FF}^{314}$ в химотрипсин-чувствительном сайте были делегированы, а остатки Asn^{162} , Asn^{713} и Asn^{719} были заменены на глутамин. Известно, что как замены в сайтах протеолиза, так и замены в сайтах спонтанного дезаминирования приводят к увеличению стабильности rPA83 (Singh *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2018), однако, возможность их сочетания в настоящей работе показана впервые. Полученный белок был назван rPA83m (rPA83 modified). Схема строения rPA83m представлена на **Рисунке 3Б**.

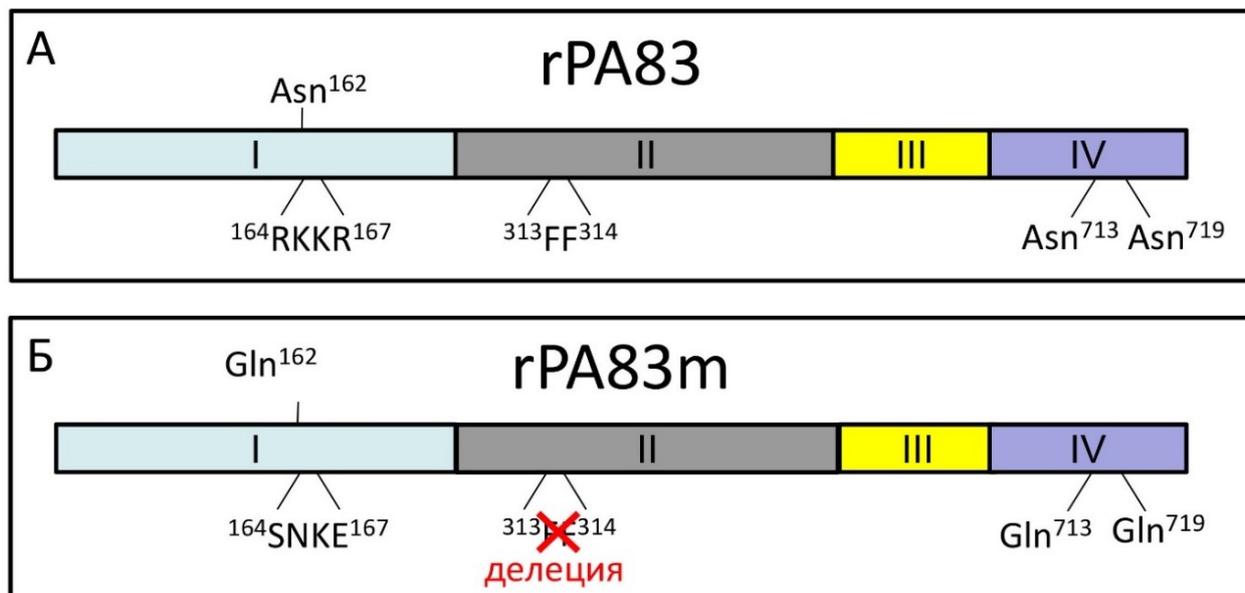


Рисунок 3. Сравнение доменной организации rPA83 (А) и модифицированного рекомбинантного РА (rPA83m) (Б). Номера аминокислотных остатков указаны в координатах нативного РА.

rPA83m был получен в *E. coli*. По сравнению с rPA83, rPA83m удалось получить с более высокой долей полноразмерной формы от общей белковой фракции (**Рисунок 4**).

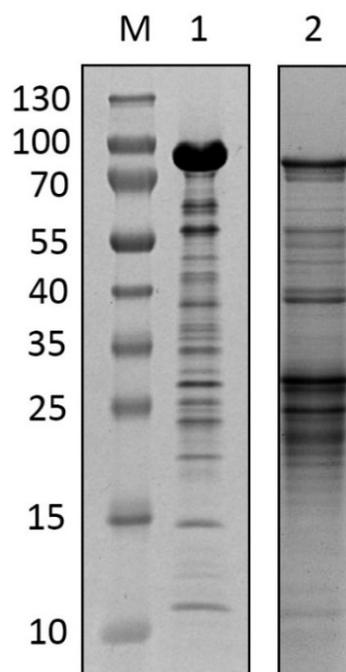


Рисунок 4. Выделенный и очищенный белок rPA83m
1 – rPA83m, 4 мкг, **2** – rPA83, 4 мкг, **М** – маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены слева)
 Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

3. Серологическая характеристика гРА83m

Продемонстрировано, что стабилизирующие замены в последовательности гРА83m не влияют на его антигенную специфичность (**Рисунок 5Б, В**).

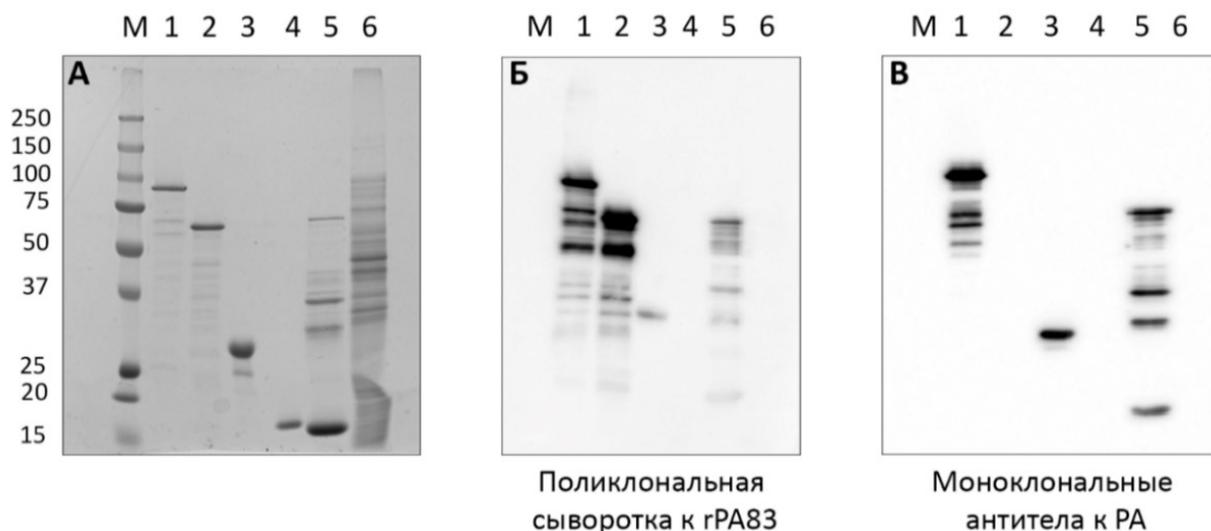


Рисунок 5. Взаимодействие гРА83m, гРА(1+2)m и гРА(3+4)m с антителами к РА

А. Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250. **Б.** Вестерн-блот с поликлональной мышинной сывороткой к гРА83. **В.** Вестерн-блот с химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА. 1 – гРА83m; 2 – гРА(1+2)m; 3 – гРА(3+4)m; 4 – вирус табачной мозаики (отрицательный контроль); 5 – гРА83 (положительный контроль); 6 – лизат клеток *E. coli* (отрицательный контроль). М – маркёры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены слева). Результаты, представленные на дорожках 2 и 3, будут описаны далее.

Эффективное взаимодействие гРА83m с поликлональной мышинной сывороткой к немодифицированному гРА83 (**Рисунок 5Б, дорожка 1**) и химерными токсин-нейтрализующими моноклональными антителами (МАТ) к РА (**Рисунок 5В, дорожка 1**) было показано методом вестерн-блот анализа. В дополнительном эксперименте было установлено, что использованные в работе МАТ узнают эпитоп в составе домена IV РА.

4. Стабильность гРА83m свободного и в композиции с СЧ ВТМ

На следующем этапе работы мы сравнили стабильность гРА83m и немодифицированного гРА83. Наиболее наглядно продемонстрировать существенно большую стабильность гРА83m по сравнению с гРА83 удалось после “состаривания” белка в течение 144 дней при +4 °С (стандартная температура хранения вакцинных препаратов). Полноразмерный гРА83 не детектировался, начиная с 33-го дня эксперимента (**Рисунок 6А, дорожка 6**). В то же время, для гРА83m интенсивность полосы, соответствующей полноразмерной форме белка, не изменилась даже спустя 144 дня инкубации (**Рисунок 6Б, дорожки 3-4**).

Другим важным параметром, требующим изучения, было изменение изоэлектрической точки (pI) белка с течением времени, поскольку дезаминирование остатков аспарагина приводит к понижению pI (Zomber *et al.*, 2005). Методом изоэлектрофокусирования мы показали, что инкубация в течение семи дней при +37 °С (условия ускоренного “состаривания” белка) не приводит к изменению изоэлектрической точки гРА83m. То есть, аминокислотные замены в составе гРА83m существенно увеличивают стабильность рекомбинантного РА. В результате, оба способа стабилизации

гРА83: внесение стабилизирующих замен в последовательность белка и использование СЧ ВТМ в качестве платформы-стабилизатора, – продемонстрировали свою эффективность.

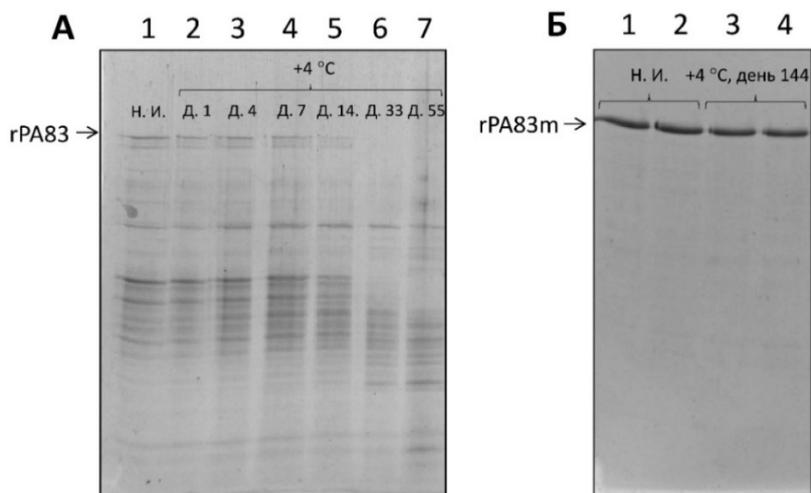


Рисунок 6. Стабильность гРА83 (А) и гРА83m (Б)

А. 1 – неинкубированный гРА83(Н.И.); 2-7 – гРА83, инкубированный при +4 °С в течение 1, 4, 7, 14, 33 или 55 дней, соответственно. **Б.** 1, 2 – неинкубированный (Н.И.) гРА83m; 3, 4 –гРА83m, инкубированный при +4 °С в течение 144 дней. гРА83 и гРА83m инкубировались в концентрации 0,2 мкг/мкл и 0,1 мкг/мкл, соответственно. На гель наносились пробы объёмом 10 мкл. Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

В связи с этим, перед нами встал вопрос о потенциальном синергетическом эффекте двух предложенных подходов к стабилизации РА. Для этого была исследована возможность адсорбции гРА83m на поверхности СЧ (Рисунок 7).

гРА83m+СЧ

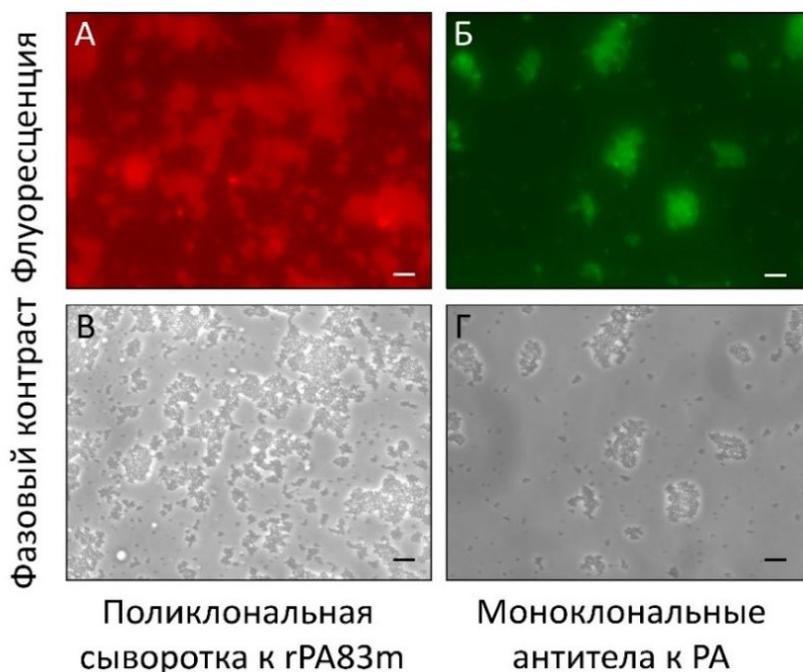


Рисунок 7. гРА83m адсорбируется на поверхности СЧ с сохранением антигенной специфичности **А, В.** Композиция гРА83m+СЧ была обработана поликлональной мышинной сывороткой к гРА83m и вторичными противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546. **Б, Г.** Композиция гРА83m+СЧ была обработана химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА и вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с CF™ 488A. Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

В данном эксперименте и далее массовое соотношение гРА83m:СЧ составляло 1:10. Композиции гРА83m+СЧ были обработаны поликлональной мышинной сывороткой к гРА83 (Рисунок 7А,В) или нейтрализующими МАТ к РА (Рисунок 7Б,Г), а затем – противовидовыми вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором. В качестве отрицательных контролей были использованы препараты, обработанные только вторичными антителами. В опытных образцах фиксировался флуоресцентный сигнал (Рисунок 7А,Б), распределённый по контурам СЧ, наблюдаемым в соответствующих образцах в режиме фазового контраста (Рисунок 7В,Г). В контрольных пробах, не обработанных первичными антителами, флуоресцентный сигнал не детектировался. Следовательно, гРА83m присутствует на поверхности СЧ ВТМ и сохраняет свою антигенную специфичность. Возможность адсорбции антигена бактериальной природы на поверхности частиц вируса растений показана в данном эксперименте впервые.

Для дальнейшего изучения стабилизирующего эффекта СЧ свободный гРА83m и гРА83m в композиции с СЧ ВТМ инкубировали при +37 °С, моделируя ускоренное “состаривание” белка (Рисунок 8). Пробы отбирали раз в три дня и анализировали методом электрофореза. Для оценки стабилизирующего эффекта СЧ был введён показатель стабильности – величина, описывающая соотношение массы полноразмерного белка в образце до и после инкубации. Он вычислялся по формуле $(X/X_{k1}+X/X_{k2})/2$, где X – объём полосы, соответствующей полноразмерной форме белка в дорожке опытного образца, а X_{k1} и X_{k2} – аналогичная величина для двух контрольных образцов.

Стабильность гРА83m при +37 °С

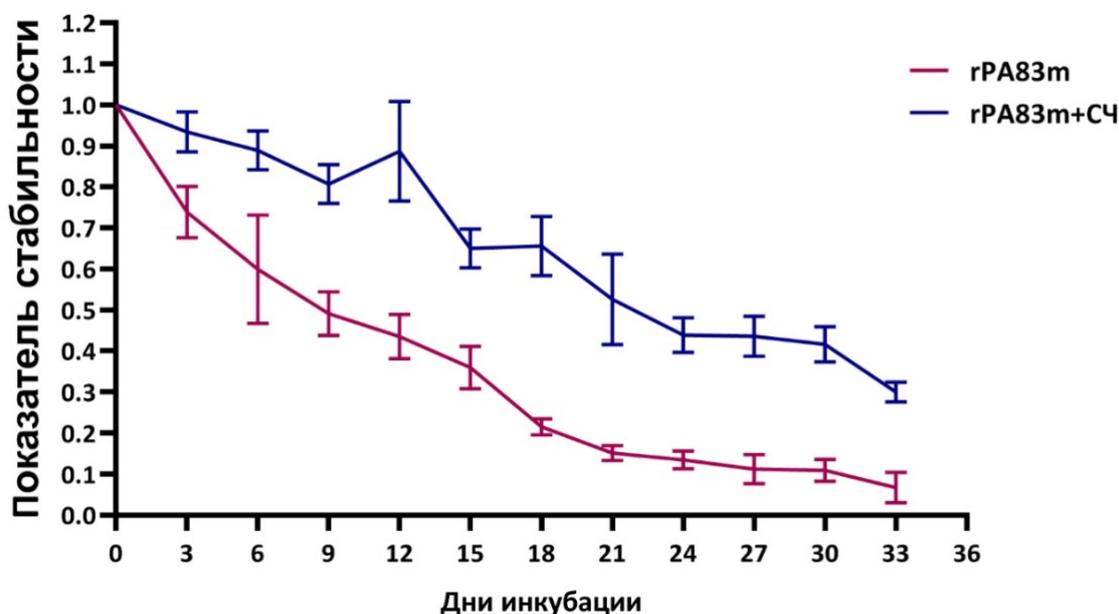


Рисунок 8. СЧ стабилизируют гРА83m при +37 °С

На графике для каждого дня инкубации представлен показатель стабильности свободного гРА83m (красный) и гРА83m в составе композиции с СЧ (синий). Показатель стабильности был рассчитан путём сравнения пяти инкубированных и двух неинкубированных образцов, использованных в качестве стандарта. Планки погрешностей соответствуют 95% доверительным интервалам.

В каждый день эксперимента показатель стабильности гРА83m в композиции с СЧ ВТМ (Рисунок 8, синий график) значимо превышал показатель стабильности свободного гРА83m (Рисунок 8, красный график). В группе гРА83m+СЧ даже спустя 33 дня инкубации при +37 °С сохранилось более 30% от изначальной массы полноразмерного гРА83m.

Аналогичные результаты были получены при инкубации свободного rPA83m и композиций rPA83m+СЧ при +25 °С в течение 231 дня. Таким образом, было показано, что стабильность rPA83m существенно повышается при адсорбции на поверхности СЧ ВТМ. В результате инкубации при +4 °С в течение 276 дней в обеих группах сохранилось не менее 65% от изначальной массы полноразмерного rPA83m, что указывает на его высокую стабильность в стандартных условиях хранения вакцинных препаратов. Разницы между двумя группами выявлено не было. Вероятно, более длительная инкубация при +4 °С позволила бы детектировать стабилизирующее действие СЧ ВТМ на rPA83m.

Также методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии было продемонстрировано, что ускоренное “состаривание” не приводит к изменению антигенной специфичности rPA83m в композиции с СЧ ВТМ.

Полученные результаты подтвердили целесообразность комбинации двух подходов к стабилизации rPA83: внесения стабилизирующих аминокислотных замен в последовательность белка и использования платформы-стабилизатора. Композиция rPA83m с СЧ ВТМ (rPA83m+СЧ ВТМ) легла в основу вакцинного кандидата против сибирской язвы, работа с которым была продолжена на животной модели.

5. Иммуногенность и протективность вакцинного кандидата rPA83m+СЧ ВТМ

Следующим, ключевым этапом работы было определение иммуногенности и протективности вакцинного кандидата rPA83m+СЧ на морских свинках. Дизайн эксперимента и описание групп иммунизации представлены на **Рисунке 9**.



№ группы	Описание препарата	Инкубация	Количество животных	Выжило после первого заражения
1	rPA83m	-	10 (5 ♀+5 ♂)	10 (5 ♀+5 ♂)
2	rPA83m+СЧ	-	10 (5 ♀+5 ♂)	10 (5 ♀+5 ♂)
3	rPA83m + Al(OH) ₃	-	10 (5 ♀+5 ♂)	8 (5 ♀+3 ♂)
4	rPA83m	27 дней при +37 °С	10 (5 ♀+5 ♂)	10 (5 ♀+5 ♂)
5	rPA83m+СЧ	27 дней при +37 °С	10 (5 ♀+5 ♂)	9 (5 ♀+4 ♂)
6	rPA83m + Al(OH) ₃	27 дней при +37 °С	10 (5 ♀+5 ♂)	9 (4 ♀+5 ♂)
7 (контроль)	СЧ	-	5 (3 ♀+2 ♂)	4 (3 ♀+1 ♂)
8 (контроль)	PBS	-	5 (2 ♀+3 ♂)	3 (1 ♀+2 ♂)

Рисунок 9. Дизайн эксперимента по определению иммуногенности и протективности препаратов на основе rPA83m. Все препараты для иммунизации были приготовлены в PBS, объём пробы для иммунизации составлял 0,3 мл.

Морские свинки были иммунизированы различными препаратами на основе rPA83m: свободным rPA83m, композицией rPA83m+СЧ ВТМ, комбинацией rPA83m+Al(OH)₃ (массовое соотношение антиген:платформа в обоих препаратах составляло 1:10) или “состаренными” препаратами аналогичного состава. Иммунизация “состаренными” препаратами была проведена для оценки влияния стабилизации rPA83m с помощью СЧ ВТМ на сохранение иммуногенности и протективности вакцинного кандидата после длительного хранения.

Для сывороток крови каждого животного методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа был установлен титр IgG к rPA83m. Сравнение иммуногенности неинкубированных препаратов (**Рисунок 10А**) показало, что титры антител к rPA83m, индуцированные как свободным rPA83m (медиана титра $4,74 \times 10^6$), так и композицией rPA83m+СЧ (медиана титра $6,94 \times 10^6$), были статистически значимо выше, чем титры, индуцированные СЧ (медиана титра $1,80 \times 10^3$) или PBS (медиана титра $1,77 \times 10^3$). В то же время, в данном эксперименте не было выявлено различия между титрами антител к rPA83m, индуцированными rPA83m+Al(OH)₃ (медиана титра $1,22 \times 10^6$) или любым из контрольных препаратов.

Таким образом, была продемонстрирована иммуногенность rPA83m как в свободной форме, так и в композиции с СЧ ВТМ, в то же время гидроксид алюминия оказал негативное влияние на иммуногенность данного антигена.

В случае “состаренных” препаратов были получены аналогичные результаты, однако иммуногенность rPA83m в композиции с СЧ ВТМ (медиана титра $2,21 \times 10^6$) была значимо выше, чем в комбинации с Al(OH)₃ (медиана титра $2,16 \times 10^5$), причём наблюдалась более чем десятикратная разница в значении титра антител (**Рисунок 10Б**). Более того, попарное сравнение иммуногенности каждого неинкубированного препарата с соответствующим инкубированным препаратом показало, что только в случае комбинации rPA83m с гидроксидом алюминия наблюдалось значимое падение иммуногенности в результате ускоренного “состаривания” белка (**Рисунок 10В**). Это подтверждает, что, несмотря на широкое использование, гидроксид алюминия не является оптимальным адьювантом-носителем для rPA83m.

Далее был оценен вклад антител к СЧ ВТМ как к платформе-носителю в индуцируемый иммунный ответ. Показано, что при иммунизации как инкубированным, так и неинкубированным препаратом rPA83m+СЧ титр антител к rPA83m был примерно в сто раз выше, чем титр к СЧ ВТМ, что является важной положительной характеристикой предложенного вакцинного кандидата.

Следующим этапом работы стало изучение протективности различных препаратов на основе rPA83m. После отбора крови морские свинки были подкожно заражены токсигенным инкапсулированным (pXO1⁺, pXO2⁺) штаммом *B. anthracis* 81/1 (2500 спор на животное). Спустя 20 дней с момента заражения смертность в опытных группах не превышала 20%, а в контрольных группах – 40%. Статистических различий в выживаемости между различными экспериментальными группами обнаружено не было.

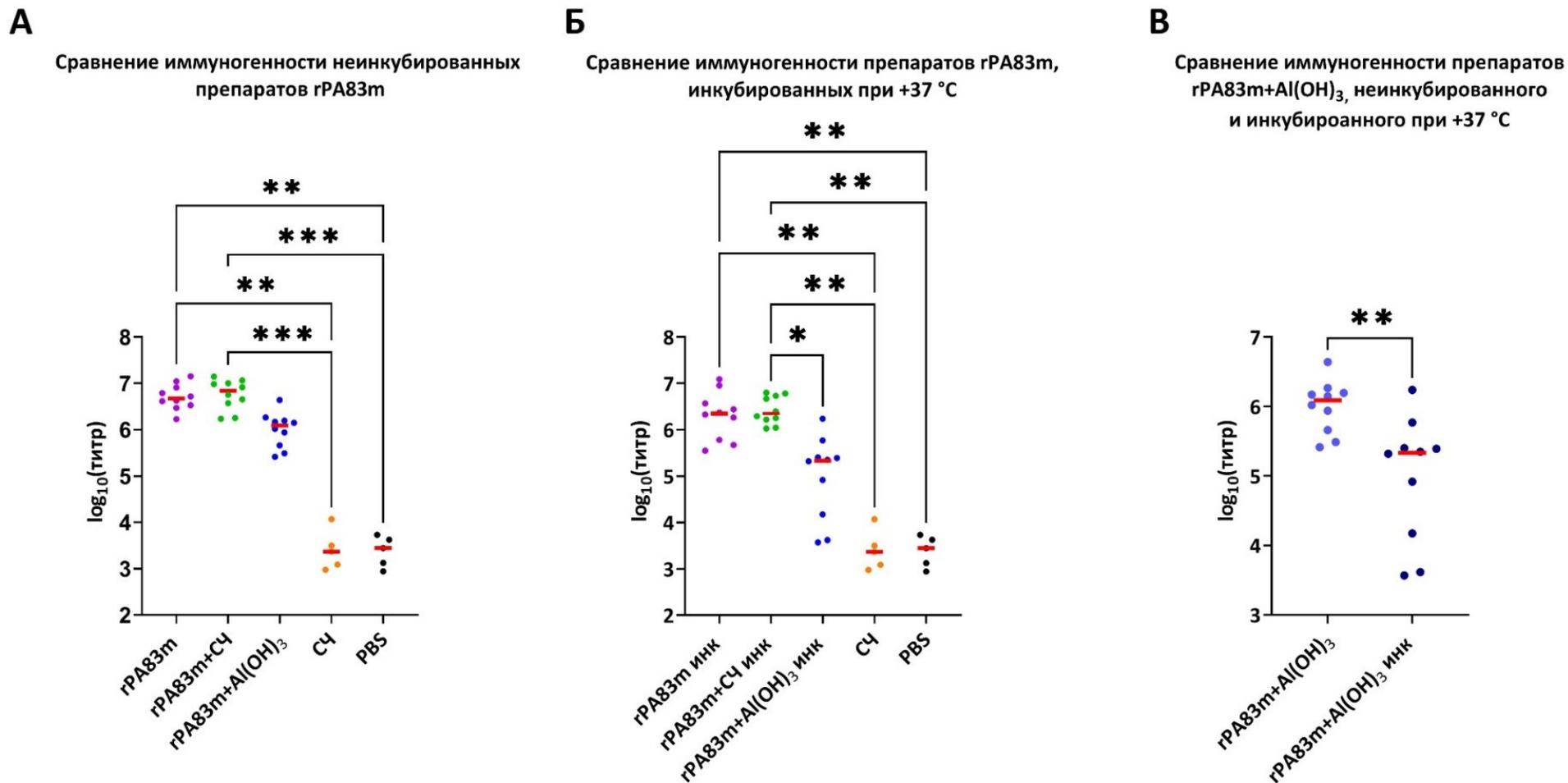


Рисунок 10. Сравнение иммуногенности различных препаратов rPA83m

А. Неинкубированные препараты rPA83m Б. Препараты rPA83m, инкубированные 27 дней при +37 °C (инк) В. Сравнение иммуногенности неинкубированного и инкубированного препаратов rPA83m+Al(OH)₃

●, титр сыворотки одной морской свинки; —, медиана. Р-значения рассчитывались с использованием теста Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна для множественных сравнений (А, Б) или теста Уилкоксона-Манна-Уитни для сравнения двух групп (В). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***P < 0.001
Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

В связи с низким уровнем смертности в контрольных группах, спустя 20 дней после первого заражения было проведено второе заражение выживших особей. Доза *B. anthracis* штамма 81/1 в этот раз была увеличена в десять раз и составила 25000 спор на животное. Уже на четвёртый день после заражения в группе морских свинок, иммунизированных только PBS, умерли все животные (**Рисунок 11, чёрный график**). Из этого можно сделать вывод, что даже если после первого заражения у животных произошло формирование иммунитета к *B. anthracis* 81/1, его в любом случае оказалось недостаточно для защиты против второго заражения большей дозой патогена. Следовательно, в опытных группах способность животных сопротивляться инфекции вызвана именно протективным эффектом препаратов на основе rPA83m.

Выживаемость животных в группах, иммунизированных неинкубированными препаратами свободного rPA83m или композиции rPA83m с СЧ ВТМ, была статистически значимо выше, чем в объединённых контрольных группах (группа СЧ + группа PBS) (**Рисунок 11А**). Более того, иммунизация препаратом rPA83m+СЧ обеспечила полную протективность против токсиногенного инкапсулированного штамма *B. anthracis* (**Рисунок 11А, зелёный график**).

В то же время выживаемость животных в группе, иммунизированной неинкубированным препаратом rPA83m+Al(OH)₃ (**Рисунок 11А, синий график**), не отличалась от контрольных групп, а также была статистически значимо ниже, чем в группе, иммунизированной композицией rPA83m с СЧ ВТМ. Таким образом, гидроксид алюминия в очередной раз оказал негативное влияние на rPA83m.

Для изучения влияния “состаривания” белка на протективность препаратов rPA83m было проведено попарное сравнение выживаемости морских свинок в группах, иммунизированных неинкубированным и инкубированным препаратом свободного rPA83m, композиции rPA83m+СЧ ВТМ или комбинации rPA83m+Al(OH)₃. Ни в одном из трёх случаев статистически значимых различий в выживаемости морских свинок обнаружено не было. Данные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния “состаривания” на эффективность всех препаратов rPA83m.

Возможно, нам не удалось детектировать разницу в протективности между “состаренными” препаратами свободного rPA83m и вакцинного кандидата rPA83m+СЧ ВТМ вследствие того, что в эксперименте была использована избыточная доза антигена. В таком случае, положительное влияние СЧ ВТМ на протективность rPA83m при длительном хранении могло бы быть заметно при использовании меньшей дозы антигена или даже при однократной иммунизации. Снижение количества антигена и числа требуемых вакцинаций – важное потенциальное преимущество любого вакцинного кандидата. В связи с этим, данный вопрос ещё предстоит детально изучить.

СЧ ВТМ могут оказаться оптимальной платформой для разработки вакцин против сибирской язвы на основе rPA83m.

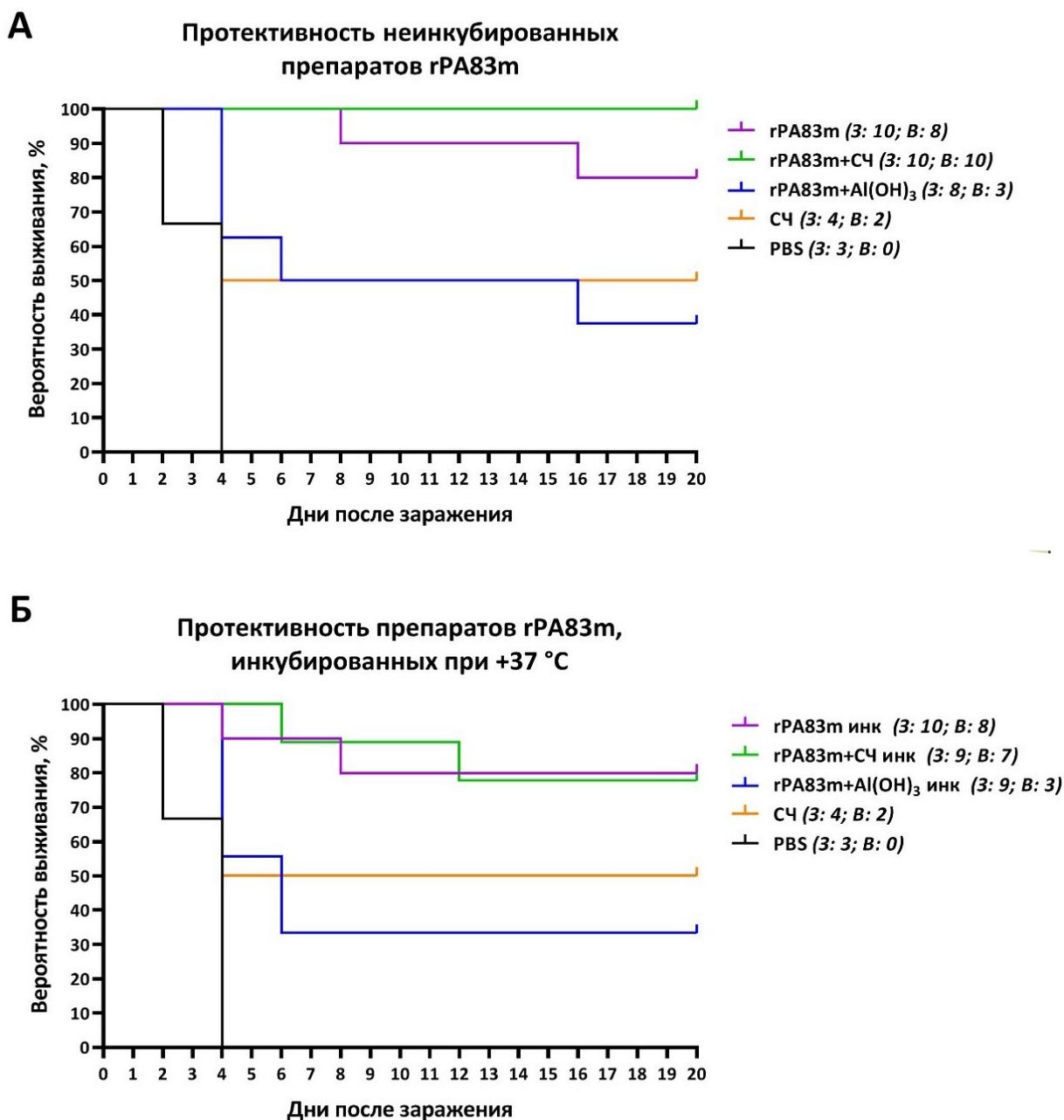


Рисунок 11. Протективность препаратов rPA83m при втором заражении морских свинок спорами *B. anthracis* штамма 81/1

На рисунке представлены кривые выживаемости морских свинок, иммунизированных неинкубированными (**А**) или инкубированными 27 дней при +37 °С (**Б**) препаратами свободного rPA83m, rPA83m+CЧ, rPA83m+Al(OH)₃, а также CЧ или только PBS. В эксперименте участвовали особи морских свинок, выжившие в результате первого заражения. Для каждой группы справа от графика приведено количество морских свинок, подвергнутых заражению (3) и выживших спустя 21 день (B).

Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

6. Создание и серологическая характеристика модифицированных рекомбинантных антигенов rPA(1+2)m и rPA(3+4)m

Для оптимизации препарата мы решили исследовать возможность создания на основе СЧ ВТМ вакцинного кандидата, содержащего два рекомбинантных антигена, первый из которых представляет собой домены I и II РА (rPA(1+2)m), а второй - домены III и IV РА (rPA(3+4)m). Схема строения антигенов rPA(1+2)m и rPA(3+4)m представлена на **Рисунке 12**. В последовательность обоих двухдоменных антигенов были внесены все замены, применённые при разработке rPA83m. Данный подход позволяет избежать экспрессии крупного (84,1 кДа) рекомбинантного белка за счёт перехода к использованию отдельно двух его частей, что может упростить процесс получения вакцины.

Антигены эффективно взаимодействовали с поликлональной мышиной сывороткой к rPA83 (**Рисунок 5Б, дорожки 2 и 3**). При этом антиген rPA(3+4)m также связывался с нейтрализующими МАТ к РА, узнающими эпитоп в составе домена IV РА (**Рисунок 5В, дорожка 3**). Антигенная специфичность обоих полученных двухдоменных рекомбинантных белков соответствует антигенной специфичности rPA83.

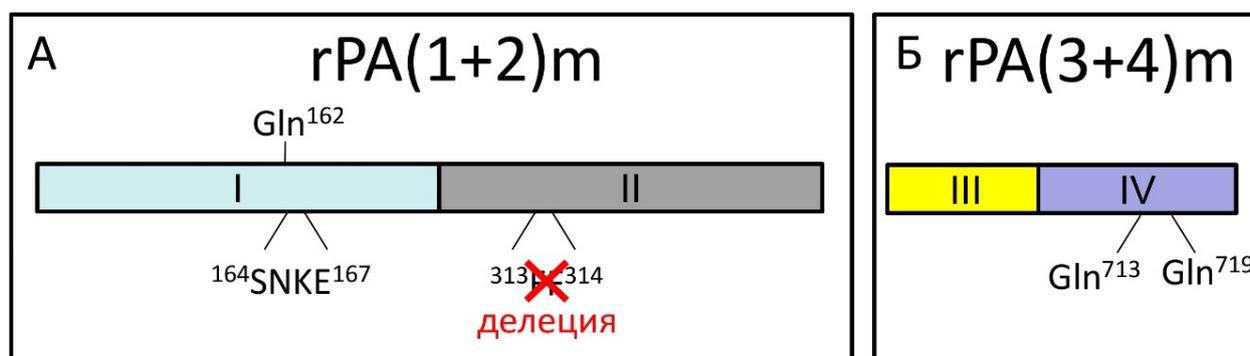


Рисунок 12. Доменная организация рекомбинантных антигенов rPA(1+2)m (А) и rPA(3+4)m (Б) Номера аминокислотных остатков указаны в координатах полноразмерного нативного РА.

7. Получение композиций rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ

На следующем этапе работы была изучена возможность получения композиций rPA(1+2)m и rPA(3+4)m с СЧ ВТМ (**Рисунок 13**). Композиции rPA(1+2)m+СЧ (**Рисунок 13А,Г**) или rPA(3+4)m+СЧ (**Рисунок 13Б,В,Д,Е**) с массовым соотношением антиген:СЧ, равным 1:10, были обработаны поликлональной мышиной сывороткой к соответствующим рекомбинантным белкам (**Рисунок 13А,Б,Г,Д**) или нейтрализующими МАТ к РА (**Рисунок 13В,Е**), а затем – противовидовыми вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором. Наличие в каждом опытном образце флуоресцентного сигнала (**Рисунок 13А,Б,В**), локализация которого совпадает с контурами СЧ, наблюдаемыми в соответствующих образцах в режиме фазового контраста (**Рисунок 13Г,Д,Е**), указывает, что оба антигена могут адсорбироваться на поверхности СЧ ВТМ, сохраняя свои антигенные свойства. В контрольных образцах, не обработанных первичными антителами, флуоресцентный сигнал не детектировался.

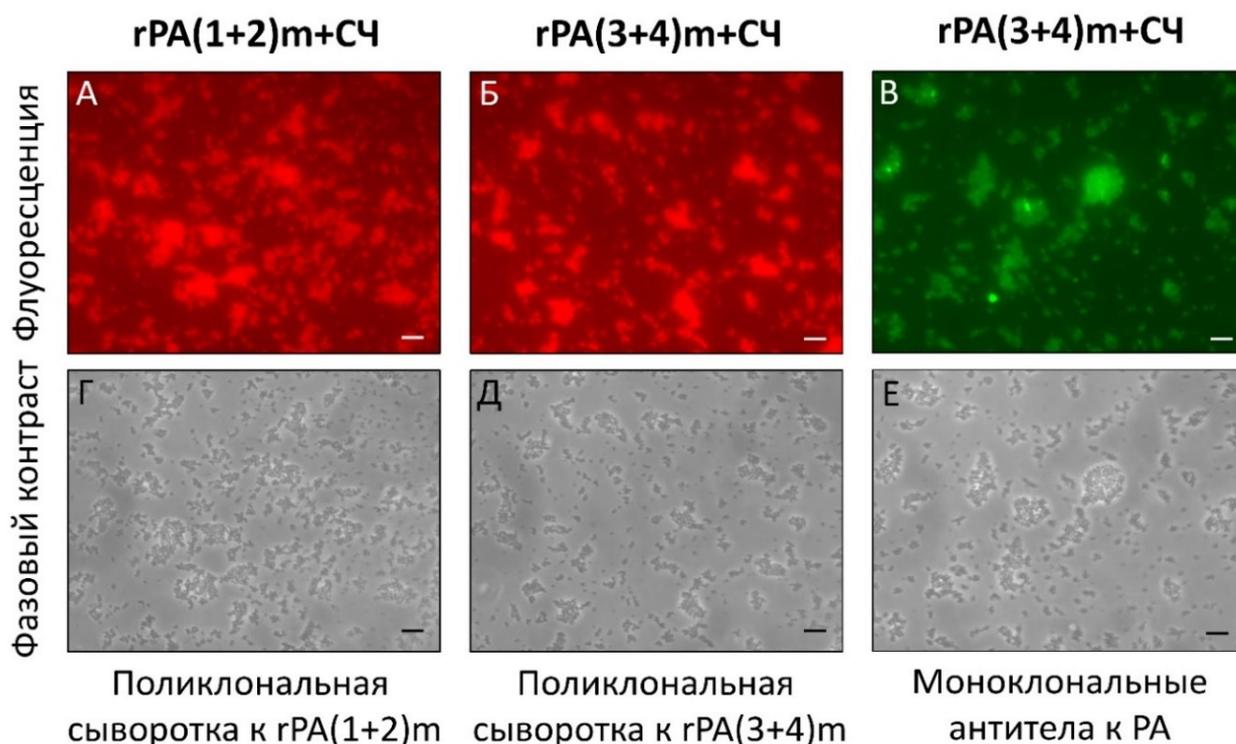


Рисунок 13. rPA(1+2)m и rPA(3+4)m адсорбируются на поверхности СЧ с сохранением антигенной специфичности. **А, Б, Г, Д.** Композиции rPA(1+2)m+CЧ (**А, Г**) или rPA(3+4)m+CЧ (**Б, Д**) были обработаны поликлональной мышинной сывороткой к rPA(1+2)m (**А, Г**) или rPA(3+4)m (**Б, Д**) и вторичными противовидовыми антителами (мышь), конъюгированными с Alexa Fluor® 546. **В, Е.** Композиции rPA(3+4)m+CЧ были обработаны химерными моноклональными нейтрализующими антителами к РА и вторичными противовидовыми антителами (человек), конъюгированными с CF™ 488A.

Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

Нам было важно продемонстрировать именно одновременную адсорбцию обоих полученных антигенов на поверхности СЧ ВТМ, что позволило бы обеспечить присутствие в вакцинном препарате полного набора нейтрализующих эпитопов РА. Для этого rPA(1+2)m был конъюгирован с флуорофором ФИТЦ, а rPA(3+4)m – с РИТЦ. Были получены композиции СЧ ВТМ с каждым из двух меченых флуорофорами белков по отдельности, а также с обоими антигенами одновременно (**Рисунок 14**).

Наличие флуоресценции как в канале ФИТЦ, так и в канале РИТЦ для композиций СЧ ВТМ с обоими мечеными антигенами (**Рисунок 14В,Е,И**) достоверно указывает на факт одновременной адсорбции rPA(1+2)m и rPA(3+4)m на поверхности сферических частиц.

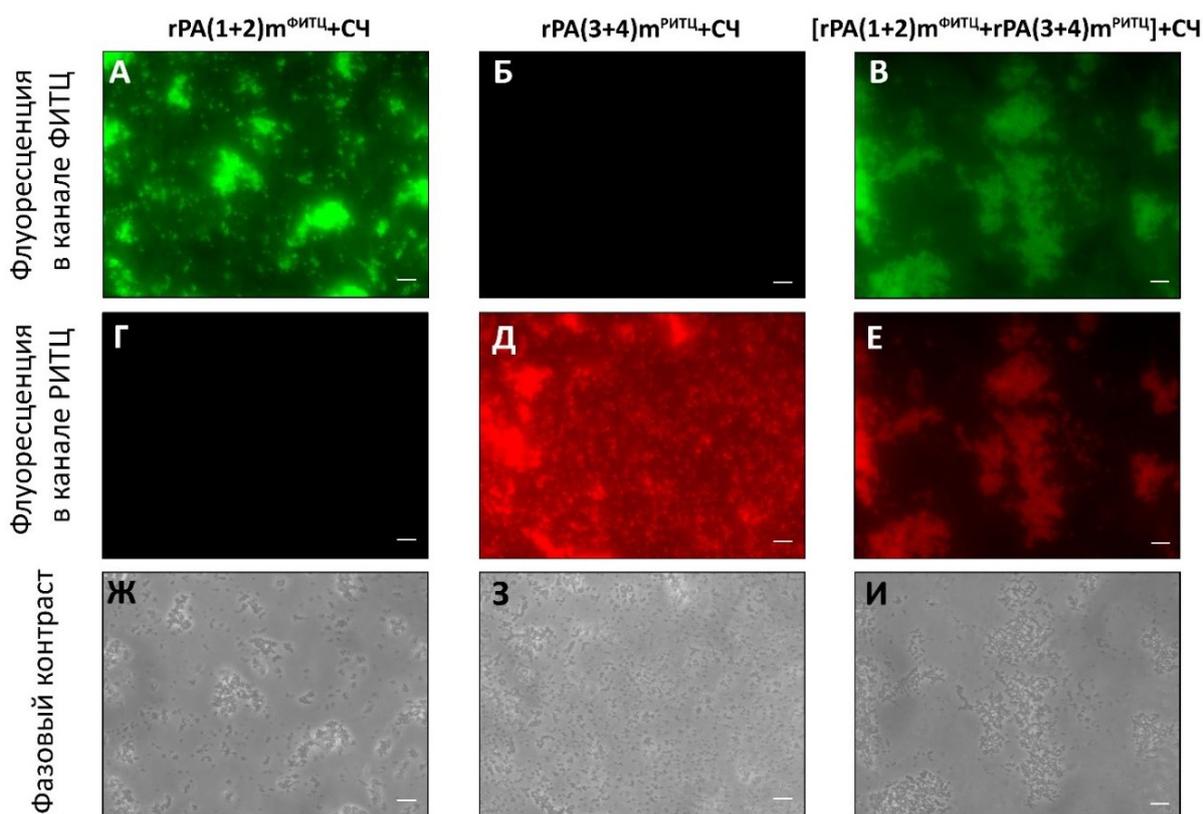


Рисунок 14. $rPA(1+2)m$ и $rPA(3+4)m$ могут быть одновременно адсорбированы на поверхности СЧ Композиции СЧ с $rPA(1+2)m$, меченым ФИТЦ ($rPA(1+2)m^{FITC}$) (**А, Г, Ж**), с $rPA(3+4)m$, меченым РИТЦ ($rPA(3+4)m^{RITC}$) (**Б, Д, З**), или с $rPA(1+2)m^{FITC}$ и $rPA(3+4)m^{RITC}$ одновременно (**В, Е, И**). Флуоресцентная микроскопия. Масштабная метка – 5 мкм.

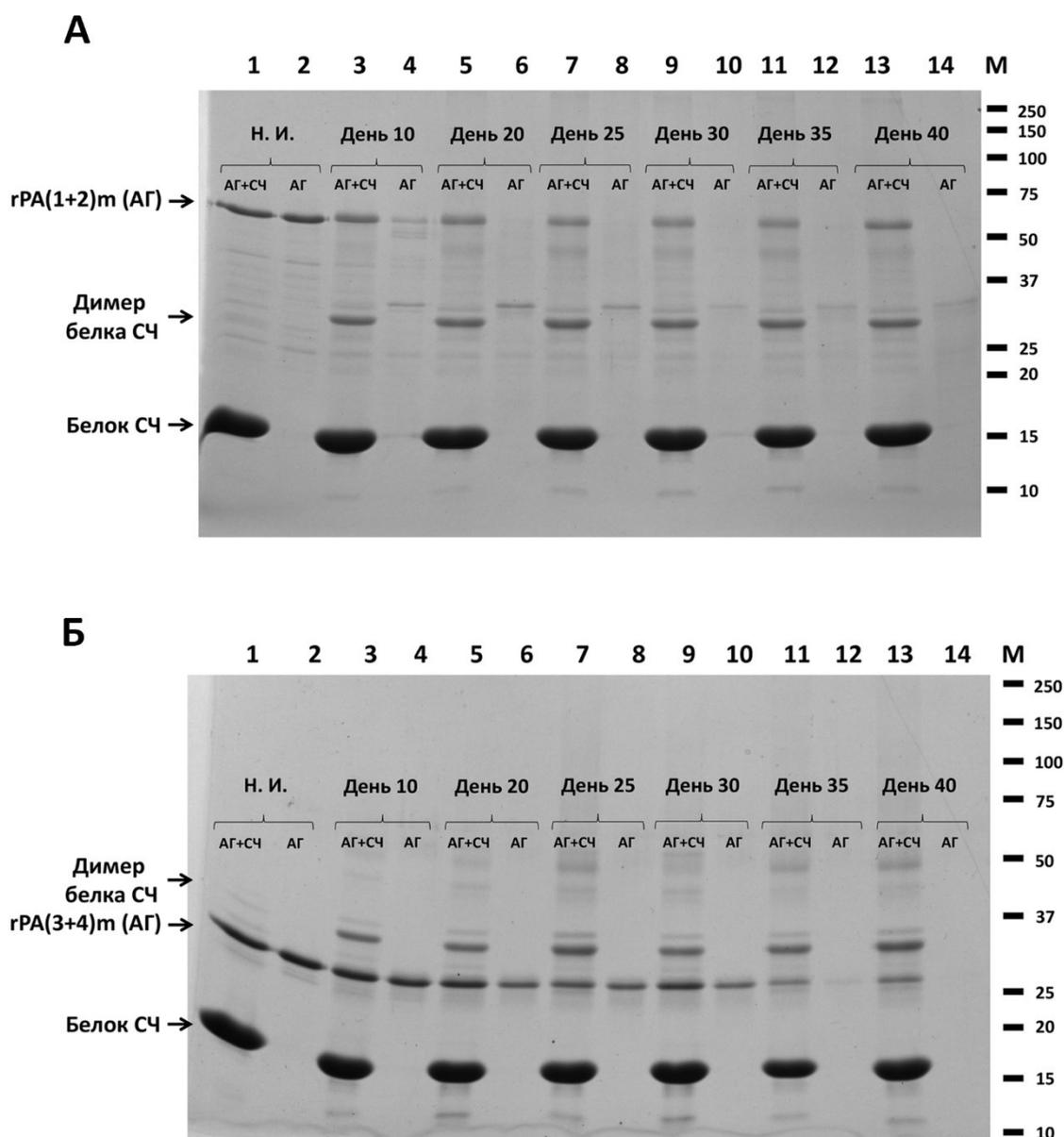
8. Стабильность $rPA(1+2)m$ и $rPA(3+4)m$ в композиции с СЧ ВТМ

Оценку стабильности $rPA(1+2)m$ и $rPA(3+4)m$ проводили индивидуально для каждого из двух антигенов. Оба антигена в свободной форме и в композиции с СЧ инкубировали в течение 40 дней при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и исследовали методом электрофореза (**Рисунок 15**).

Для свободных антигенов полоса, соответствующая на геле полноразмерному $rPA(1+2)m$, не детектировалась уже на 20-й день (**Рисунок 15А, дорожка 6**), а полноразмерному $rPA(3+4)m$ – на 35-й день (**Рисунок 15Б, дорожка 12**). При этом в обоих препаратах композиции антиген+СЧ она отчётливо визуализировалась даже спустя 40 дней инкубации (**Рисунок 15А,Б, дорожка 13**). Значения коэффициента стабильности обоих антигенов приведены в таблице на **Рисунке 15** (представлено среднее геометрическое значение по двум повторностям эксперимента).

Также методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии было подтверждено, что “состаривание” $rPA(1+2)m$ и $rPA(3+4)m$ в композиции с СЧ ВТМ не приводило к изменению антигенной специфичности данных белков: оба антигена взаимодействовали с поликлональной мышинной сывороткой к $rPA83m$, а $rPA(3+4)m$ также взаимодействовал с нейтрализующими МАТ к эпитопу в составе домена IV PA.

Стабилизация $rPA(1+2)m$ и $rPA(3+4)m$ с помощью СЧ ВТМ доказывает возможность использования данных частиц в вакцинном кандидате, содержащем оба рекомбинантных антигена, и еще раз подтверждает целесообразность применения СЧ ВТМ в качестве платформы-стабилизатора при разработке препаратов.



Белок	Состав образца	Показатель стабильности					
		День 10	День 20	День 25	День 30	День 35	День 40
rPA(1+2)m	rPA(1+2)m+C4	0,85	0,51	0,50	0,46	0,32	0,58
	rPA(1+2)m	0,23	0,08	0	0	0	0
rPA(3+4)m	rPA(3+4)m+C4	0,77	0,62	0,46	0,50	0,31	0,39
	rPA(3+4)m	0,645	0,29	0,39	0,19	0,06	0,05

Рисунок 15. СЧ стабилизируют rPA(1+2)m и rPA(3+4)m при +37 °С

А. rPA(1+2)m. **Б.** rPA(3+4)m. **1, 3, 5, 7, 9, 11, 13** – композиция rPA(1+2)m или rPA(3+4)m с СЧ; **2, 4, 6, 8, 10, 12, 14** – свободный рекомбинантный антиген сибирской язвы. **1, 2** – неинкубированные образцы (Н.И.) ; **3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14** – образцы, инкубированные при +37 °С в течение 10, 20, 25, 30, 35 или 40 дней, соответственно.

М – маркеры молекулярной массы белков (молекулярные массы в кДа приведены справа)

АГ – антиген – rPA(1+2)m (**А**) или rPA(3+4)m (**Б**)

Электрофоретический анализ в 8-20% ДСН ПААГ, окрашивание Кумаси G-250.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе создан и охарактеризован вакцинный кандидат против сибирской язвы на основе сферических частиц (СЧ), образованных в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ), и рекомбинантного модифицированного антигена сибирской язвы гРА83m.

Разработан и получен белок гРА83m – рекомбинантный полноразмерный протективный антиген (РА) *Bacillus anthracis*, в последовательность которого были внесены стабилизирующие замены. В сайте расщепления фурином фрагмент ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷ был заменён на ¹⁶⁴SNKE¹⁶⁷, в сайте расщепления химотрипсином была произведена делеция ³¹³FF³¹⁴. Аминокислотные остатки Asn¹⁶², Asn⁷¹³ и Asn⁷¹⁹, подверженные спонтанному дезаминированию, были заменены на глутамин. Впервые одновременно внесены замены как в сайты протеолиза, так и в сайты спонтанного дезаминирования в протективном антигене сибирской язвы.

Показано, что гРА83m взаимодействует с поликлональной сывороткой и моноклональными нейтрализующими антителами к РА, а также имеет более высокую стабильность, чем рекомбинантный РА (гРА).

В качестве второго подхода к стабилизации РА в настоящей работе впервые было предложено использование СЧ ВТМ как носителя для гРА83m. Продемонстрировано, что гРА83m способен адсорбироваться на поверхности СЧ ВТМ с сохранением антигенных свойств. При этом стабильность гРА83m в композиции с СЧ значительно увеличивалась по сравнению со свободным антигеном как при +25 °С, так и в условиях ускоренного “состаривания” белка при +37 °С. Впервые комбинация двух подходов: внесение замен в последовательность рекомбинантного РА и использование СЧ ВТМ в качестве платформы-носителя, – позволила добиться высокой стабильности полученного вакцинного кандидата.

Проведена иммунизация морских свинок свободным гРА83m, а также гРА83m в композиции с СЧ ВТМ или в комбинации с гидроксидом алюминия – стандартным адъювантом, применяемым в ряде лицензированных вакцин против сибирской язвы. Для всех препаратов было изучено влияние инкубации +37 °С в течение 27 дней на их иммуногенность. Как свободный гРА83m, так и вакцинный кандидат гРА83m+СЧ ВТМ обеспечили выработку высокого титра антител к гРА83m при двукратной иммунизации. Важно отметить, что титр антител к СЧ как к платформе-носителю был примерно в сто раз меньше. “Состаривание” не повлияло на иммуногенность вакцинного препарата. При этом было показано, что инкубация в аналогичных условиях препарата, содержащего в качестве адъюванта для гРА83m гидроксид алюминия, приводит к более чем пятикратному снижению титра индуцируемых при иммунизации антител к гРА83m.

Иммунизация вакцинным кандидатом гРА83m+СЧ ВТМ обеспечила стопроцентную протективность на морских свинках при заражении полностью вирулентным штаммом *B. anthracis* 81/1. При этом в группе, иммунизированной гРА83m в комбинации с гидроксидом алюминия, в результате заражения остались в живых только 30% морских свинок. Искусственное “состаривание” препарата не оказало значимого негативного влияния на его протективные свойства. Полученные результаты позволяют предположить возможность сохранения протективного эффекта при иммунизации меньшей дозой вакцинного кандидата или даже при однократной иммунизации, что требует дальнейших исследований.

В качестве дополнительного варианта вакцинного кандидата против сибирской язвы была предложена композиция СЧ ВТМ одновременно с двумя двухдоменными антигенами: rPA(1+2)m (домены I и II РА) и rPA(3+4)m (домены III и IV РА), - в последовательности которых были внесены все аминокислотные замены, использованные при дизайне rPA83m. Продемонстрирована одновременная адсорбция обоих белков на поверхности СЧ ВТМ, а также стабилизация каждого антигена в присутствии СЧ.

Таким образом, в настоящей работе впервые был получен вакцинный кандидат против сибирской язвы с высоким уровнем стабильности, содержащий модифицированный полноразмерный рекомбинантный РА и структурно модифицированные частицы вируса растений в качестве платформы-стабилизатора, который обеспечил формирование у морских свинок протективного иммунного ответа, достаточного для полной защиты от инфекции *B. anthracis*.

ВЫВОДЫ

1) Разработан и получен рекомбинантный антиген rPA83m – модифицированный протективный антиген *Bacillus anthracis* (РА) со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза и дезаминирования. Подтверждена его антигенная специфичность, а также показано, что rPA83m обладает большей стабильностью, чем немодифицированный рекомбинантный РА (rPA).

2) Сферические частицы (СЧ), образованные в результате термической перестройки вируса табачной мозаики (ВТМ), способны стабилизировать rPA и rPA83m, а также адсорбировать rPA83m, не изменяя его антигенную специфичность. Получен вакцинный кандидат – композиция rPA83m+СЧ ВТМ.

3) Свободный rPA83m и вакцинный кандидат rPA83m+СЧ иммуногенны, при этом иммуногенность обоих препаратов значимо не снижается в результате инкубации в течение 27 дней при +37 °С.

4) Вакцинный кандидат rPA83m+СЧ ВТМ обеспечивает протективность (100%) у морских свинок против полностью вирулентного штамма *B. anthracis*. Инкубация вакцинного кандидата в течение 27 дней при +37 °С не оказывает значимого влияния на его протективные свойства.

5) Разработаны и получены двухдоменные рекомбинантные антигены, представляющие собой модифицированные домены I и II РА – rPA(1+2)m – или домены III и IV РА – rPA(3+4)m – со стабилизирующими заменами в сайтах протеолиза и спонтанного дезаминирования, не изменяющими их антигенную специфичность.

6) СЧ ВТМ стабилизируют rPA(1+2)m и rPA(3+4)m, не изменяя их антигенные свойства. Показана возможность одновременной адсорбции rPA(1+2)m и rPA(3+4)m на поверхности СЧ ВТМ.

Список публикаций по теме диссертации

1. Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., **Granovskiy D.L.**, Ivanov P.A., Atabekov J.G., Kondakova O.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Two approaches for the stabilization of bacillus anthracis recombinant protective antigen // *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2021. V. 17. № 2. P 560–565. JIF (WoS) 4,3. Доля участия 30%, 0.375 п.л.
2. Ryabchevskaya E.M., **Granovskiy D.L.**, Evtushenko E.A., Ivanov P.A., Kondakova O.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Designing stable bacillus anthracis antigens with a view to recombinant anthrax vaccine development // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 4. P. 806. JIF (WoS) 5.4. Доля участия 50%, 1.375 п.л.
3. **Granovskiy D.L.**, Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Kondakova O.A., Arkhipenko M.V., Kravchenko T.B., Bakhteeva I.V., Timofeev V.S., Nikitin N.A., Karpova O.V. New formulation of a recombinant anthrax vaccine stabilised with structurally modified plant viruses // *Frontiers in microbiology*. 2022. V.13. P. 1003969. JIF (WoS) 5.2. Доля участия 50%, 0.875 п.л.
4. **Granovskiy D.L.**, Khudainazarova N.S., Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Arkhipenko M.V., Kovrizhko M.V., Kolpakova E.P., Tverdokhlebova T.I., Nikitin N.A., Karpova O.V. Novel universal recombinant rotavirus a vaccine candidate: Evaluation of immunological properties // *Viruses*. 2024. V. 16. № 3. P. 438. JIF (WoS) 3.8. Доля участия 40%, 1.188 п.л.
5. Khudainazarova N.S., **Granovskiy D.L.**, Kondakova O.A., Ryabchevskaya E.M., Kovalenko A.O., Evtushenko E.A., Arkhipenko M.V., Nikitin N.A., Karpova O.V. Prokaryote- and eukaryote-based expression systems: Advances in post-pandemic viral antigen production for vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 V. 25. №. 22. P. 11979. JIF (WoS) 4,9. Доля участия 50%, 3.375 п.л.
6. Кондакова О.А., Никитин Н.А., Евтушенко Е.А., **Грановский Д.Л.**, Атабеков И.Г., Карпова О.В. Сибирская язва: жизненный цикл, механизмы патогенеза и новые концепции в развитии ветеринарных вакцин // *Сельскохозяйственная биология*. 2021. Т. 56. № 3. С. 415–433. JIF (РИНЦ) 1.5. Доля участия 25%, 1.187 п.л.