

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.2

НОВЫЙ ТИП ПЛАТФОРМ ДЛЯ СБОРКИ ВАКЦИН *IN VITRO*И.Г. Атабеков^{1,2}, Н.А. Никитин², О.В. Карпова²⁽¹⁾ Центр “Биоинженерия” РАН, г. Москва; ⁽²⁾ кафедра вирусологии; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru)

Изучение структуры вирионов фитовирусов и вирусных белков оболочки, а также возможностей их модификации и структурной перестройки крайне важно для разработки абсолютно новых подходов для создания биотехнологической продукции, в том числе медицинского назначения. Вирусы растений обладают безусловным преимуществом при получении новых функциональных и биологически активных материалов, в частности кандидатных вакцин, так как они не патогенны для млекопитающих, в том числе для человека. В настоящем обзоре основное внимание сосредоточено на характеристике и применении в биотехнологии сферических частиц (СЧ) — платформ нового типа, полученных в результате структурной перестройки вирусов растений. СЧ не имеют структурных аналогов среди икосаэдрических вирусов и представляют собой новый тип биогенных платформ. Сборка иммуногенных комплексов СЧ-антиген *in vitro* открывает перспективы недорогого и быстрого получения разнообразных вакцинных препаратов.

Ключевые слова: спиральные вирусы, сферические частицы, платформы, комплексы с целевыми антигенами, иммуногенность, адъювантные свойства, обзор.

Вирусы растений в качестве инструментов биотехнологий

Вирусы растений, состоящие из идентичных субъединиц белка оболочки (БО) и РНК, могут применяться в качестве строительных блоков-матриц для создания различных бионеорганических материалов: нанотрубок, нанопроводников, наноэлектродов, наноконтейнеров, для инкапсуляции неорганических соединений и получения неорганических нанокристаллов [1]. В силу своей химической и биологической полифункциональности вирусные частицы могут быть модифицированы с сохранением их структуры как химически, так и методами генной инженерии. Вирусы растений абсолютно безопасны для человека и сельскохозяйственных животных, так как растения и животные не содержат общих патогенов [2].

Полногеномные вирионы вирусов растений могут использоваться в качестве платформ для присоединения к их поверхности чужеродных антигенных детерминант. По данным Акоста-Ранирез с соавт. [3], вирус мозаики папайи (ВМП) в смеси с антигеном *Salmonella typhi* способен стимулировать иммунный ответ на целевой антиген. Аналогичные результаты могут быть получены с применением вирусоподобных частиц (ВПЧ), полученных при экспрессии БО ВМП в клетках *E. coli* [4, 5]. Имеющиеся сведения о структуре БО многих вирусов позволяют направленно присоединять целевой полипептид к концевым аминокислотам, локализованным на поверхности вирусной частицы. В частности, структура белковых субъединиц вируса табачной мозаики (ВТМ) изучена достаточно детально, что

позволяет локализовать положение разных аминокислот на поверхности вирусных частиц [6, 7]. Присоединение (химическим или генно-инженерным способом) активного чужеродного белка/пептида к поверхности субъединиц БО самореплицирующегося вируса позволяет использовать такие конструкции в качестве инструментов для прямой реализации активности чужеродного белка/пептида в составе модифицированного вируса. Так были сконструированы частицы ВТМ, несущие на С-конце субъединиц БО крупный фрагмент протеина А, сохранивший способность связывать моноклональные антитела при их очистке [8], или созданы частицы Х-вируса картофеля, несущие молекулы фермента липазы на N-конце субъединиц [9].

Создание на основе полноразмерных геномов фитовирусов векторов, содержащих в своем составе последовательности чужеродных антигенов, при экспрессии которых в растениях образуются вирусные частицы, несущие на своей поверхности антигенные детерминанты патогенов человека, открыло новые возможности в получении безопасных кандидатных вакцинных препаратов [10–13].

Важным направлением практической реализации этих принципов является создание вакцинных препаратов с использованием самореплицирующихся частиц, несущих на своей поверхности в качестве целевого пептида антигенную детерминанту (эпитоп) патогена или иной функционально активный полипептид. Так, были созданы химерные формы геномов тобамо- и потексвирусов, продуцирующие вирусные или вирусоподобные частицы, несущие эпитопы патогенов [2, 14, 15]. Химерный ВТМ, созданный на основе слияния субъединиц

БО с эпитопом М2е вируса гриппа А человека, в опытах на лабораторных животных обладал протекторной активностью, т.е. являлся кандидатной вакциной [16].

Преимущества вакцин, созданных на основе включения эпитопа в ген БО, перед аттенуированными химически инактивированными вирусами и субъединичными вакцинами определяются исключением возможности реверсий и рекомбинаций патогена, а также получением высоких титров антител при иммунизации животных в отсутствие адъювантов ввиду высокой иммуногенности вирусных частиц [16].

Создание вирусов-векторов может быть достигнуто в результате замены одного или части генов (деконструкции вируса) на ген(ы) целевого белка. Удаление генов межклеточного транспорта и БО полностью блокирует транспорт вируса по растению, сохраняя способность РНК реплицироваться в форме репликона. В отсутствие традиционного межклеточного транспорта доставка вирусов-векторов в клетки растения и массовое накопление целевого белка достигается с помощью агробактериальной инфильтрации вируса вектора [17]. Наработка целевых белков в растениях не требует применения дорогостоящих культуральных сред, аппаратуры и системы стерильности, в результате чего стоимость белков, получаемых в растениях, в 10–30 раз ниже стоимости аналогичных белков, получаемых в бактериальных или животных клетках [18]. Сконструированы различные варианты векторов этого типа [12].

Удобным объектом для конструирования деконструктивных векторов является вирус Х картофеля (ХВК) и другие потексвирусы. Вирусы-векторы на основе генома потексвирусов использовались для продукции в растениях целевых белков различного происхождения, включая вирус иммунодефицита человека I [19], антигены *Mycobacterium tuberculosis* [20] и миелоцитокины [21].

Известны и так называемые аффинно-конъюгированные антигенные системы. Такие системы включают в себя рекомбинантные вирусы с БО, несущим участок связывания чужеродного целевого белка. В этих случаях ген вирусного БО следует генетически модифицировать введением вставок или делеций для получения аффинных участков связывания целевых субстанций белковой природы. Например, в БО ВТМ вводили реактивный лизин в N-концевую часть для связывания вирусной частицы с биотином. В независимых опытах получали зеленый флуоресцентный белок, ковалентно связанный со стрептавидином. В результате специфического авидин-биотин взаимодействия получали частицы вируса, декорированного зеленым флуоресцентным белком медузы. Использование аффинно-конъюгированных систем обладает рядом недостатков: относительно невысокая биологическая активность, сложность и многоступенчатость процедуры приготовления. Необходимо получить

модифицированный биотином БО вируса биотин либо стрептавидин-меченный целевой белок, кроме того, необходима сложная многоступенчатая очистка комплекса “вирус-биотин-стрептавидин-целевой белок” [22].

Перспективным для использования в качестве платформы при создании высокоиммуногенных комплексов и продукции антител к целевому антигену является рекомбинантный ядерный антиген вируса гепатита В (НВсAg). Выполняя роль носителя чужеродных антигенных детерминант, НВсAg образует симметричные икосаэдрические (30 нм) частицы, придавая высокую иммуногенность встроенным чужеродным антигенным детерминантам. Метод освоен на продукции растительным вирусом-вектором рекомбинантного НВсAg-носителя со вставкой эпитопов М2е вируса гриппа А [23, 24], эпитопов гликопротеина Е1 вируса краснухи [25]. Введение чужеродных пептидных фрагментов как в N-, так и в С-концевую часть НВсAg не нарушает процесса его самосборки, и при этом пептиды оказываются экспонированными на поверхности молекулы.

Целью настоящей работы является обсуждение структуры и уникальных свойств принципиально нового типа платформ — сферических частиц, образуемых при кратковременном нагревании спиральных вирусов растений (с высвобождением РНК) и способных адсорбировать на поверхности самые разные антигенные детерминанты, образуя высокоиммуногенные вакцинные комплексы СЧ-иммуноген.

Структурная перестройка спиральных вирусов растений в сферические частицы-платформы

Лауффер и Прайс [26] доказали, что тепловая инактивация ВТМ сопровождается денатурацией вирусного БО. Особенностью ВТМ является высокий уровень термостабильности: инфекционность вируса частично сохраняется даже после инкубации инфекционного сока в течение 10 мин при 90°C. Было показано, что инактивация инфекционности ВТМ непосредственно связана с денатурацией вирусного БО. Около 60 лет назад было показано, что при нагревании ВТМ в течение 10 сек при 98°C палочковидные вирионы перестраиваются в округлые частицы, объем которых соответствует объему нативного вируса [27]. К сожалению, эта работа не была продолжена, и структура продуктов перестройки ВТМ не была исследована.

В последние годы детальное изучение структурной перестройки спиральных частиц ВТМ (и некоторых других спиральных вирусов) с образованием сферических частиц было проведено группой вирусологов МГУ. В частности, было показано, что размеры СЧ варьировали в широких пределах и по большей части не соответствовали по объему нативным частицам ВТМ (53 нм). СЧ нерастворимы

в воде, гетерогенны по размерам, но идентичны по форме. СЧ находятся в форме стабильных коллоидных растворов или в виде относительно стабильных суспензий (в зависимости от размеров СЧ). Размеры СЧ варьируют от наночастиц (диаметр 50–150 нм) до микрочастиц (диаметр 150–800 нм). Было показано, что размер СЧ зависит от применяемой исходной концентрации вируса, т.е. размеры частиц могут контролироваться [28].

СЧ образуются в результате термической денатурации и конформационной перестройки БО нативных частиц ВТМ. Точнее, СЧ состоят из термически денатурированных субъединиц БО, специфически собираемых в сфероид в результате двухступенчатой сборки. Электронно-микроскопический анализ позволил выявить по крайней мере две фазы сборки СЧ. На первой стадии (при 90°C) образовывались гантеливидные структуры, у которых часть палочки уже преобразована в форму, приближающуюся к сферической на обоих или на одном конце вириона (рис. 1, а). На этом этапе сборки присутствовало также значительное количество дискретных частиц неправильной формы и разных размеров (рис. 1, б), которые в дальнейшем трансформировались в СЧ при 94–98°C (рис. 1, в, г) [28].

Показано, что СЧ исключительно стабильны. Так, СЧ не изменяют форму и размеры, не сливаются и не агрегируют друг с другом при хранении и ряде обработок, включая повторное замораживание до –20°C с последующим оттаиванием, повторное нагревание до 98°C и охлаждение, осаждение центрифугированием при 10 000хg и ресуспендирование, а также хранение в течение длительного времени (более года) при 4°C и при комнатной температуре. Последнее, по-видимому, объясняется

тем, что формирование СЧ осуществляется при 98°C, т.е. в условиях стерилизации [28].

Следует заметить, что образование СЧ происходит не только с применением спиральных частиц нативного ВТМ. С равным успехом СЧ могли быть получены с применением препаратов любых агрегатных форм БО ВТМ, включая 20S двойной диск, 4S тример субъединиц и даже мономерную форму БО ВТМ. В соответствии с нашими ожиданиями СЧ формировались из реполимеризованных спиральных частиц БО, не содержащих РНК. Особенность получения СЧ с применением промежуточных агрегатов БО ВТМ, не содержащих РНК, состояла в том, что формирование СЧ в таких системах происходило при пониженной по сравнению с нативным вирусом температуре (65°C, а не 94–98°C) [28].

При термической денатурации ВТМ субъединицы белка оболочки приобретают конформацию, которая является благоприятной для образования частиц сферической формы различного размера.

Ряд структурных особенностей белка СЧ-платформ был охарактеризован с применением методов кругового дихроизма, флуоресцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света [29]. Было обнаружено, что структура белка СЧ значительно отличается от структуры БО в составе нативного ВТМ. Трансформация ВТМ–СЧ сопровождается конформационной перестройкой субъединиц нативного БО ВТМ, который содержит около 50%, в то время как в составе СЧ содержание α -спиралей резко снижено при значительном увеличении содержания фракции β -структур. Показано, что белок СЧ активно реагирует с тиофлавином Т, что указывает на образование амилонидоподобных структур [29]. Термическая денатура-

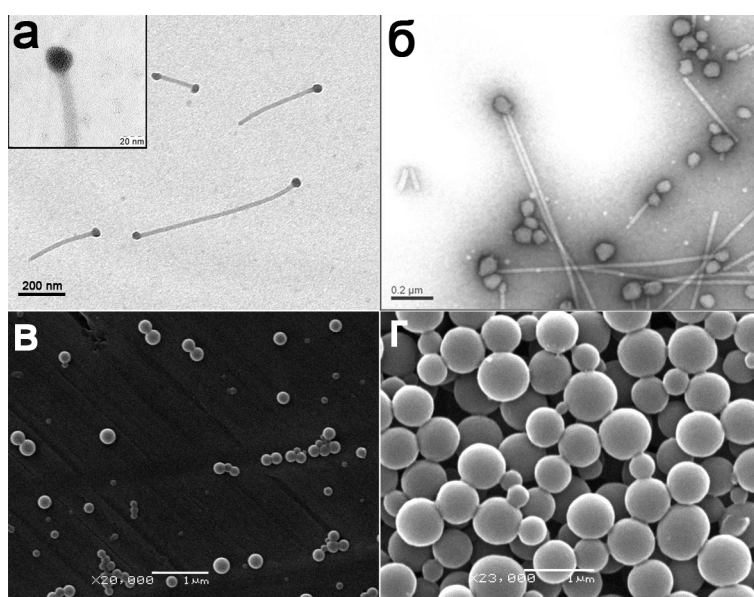


Рис. 1. Образование сферических частиц (СЧ) из вируса табачной мозаики (ВТМ) в процессе термической перестройки: (а–б) переходные формы, являющиеся предшественниками СЧ. Просвечивающая электронная микроскопия, окрашивание 2% уранил ацетатом; (в–г) сферические частицы, полученные при нагревании до 94°C препаратов нативного ВТМ с исходной концентрацией вируса 1 мг/мл; (в) 10 мг/мл (г). Сканирующая электронная микроскопия [28]

ция и изменение конформации субъединиц белка оболочки делает их нерастворимыми в воде и приводит к их ассоциации с образованием СЧ. Весьма вероятно, что денатурация БО ВТМ сопровождается увеличением степени гидрофобности поверхности СЧ [29].

Перестройка спиральных вирионов с образованием СЧ наблюдалась при термической обработке и других вирусов растений со спиральной структурой. В частности, показано, что нитевидные частицы ХВК перестраиваются в СЧ при термоденатурации вирионов [30]. По-видимому, феномен структурной реорганизации с образованием СЧ универсален для таксономически разных спиральных вирусов.

Сборка *in vitro* иммуногенных комплексов из СЧ-платформ и чужеродных антигенов

Демонстрация индукции иммунного ответа является ключевым этапом при создании вакцинного препарата. В серии опытов Карпова с соавт. [31] сформировали и охарактеризовали комплексы, состоящие из СЧ и чужеродного “целевого” компонента (белок/эпитоп), связанного с поверхностью СЧ-платформы.

Следует отметить, что в отличие от частиц нативного ВТМ СЧ-платформы оказались способны активно адсорбировать на поверхности разнообразные чужеродные белки [31]. Таким образом, состояние денатурированного БО ВТМ оказалось весьма благоприятным для неспецифической адсорбции на поверхности СЧ структурно и функционально неродственных белков. Ниже перечислены некоторые антигены, которые эффективно связываются с поверхностью СЧ-платформ, образуя иммуногенные композиции: белок оболочки ХВК, N-терминальный эпитоп М2е трансмембранного поверхностного белка М2 вируса гриппа человека А; полипептид гемагглютинаина вируса гриппа А человека; тетраэпитоп А гликопротеина Е1 вируса краснухи [31].

Эти и другие результаты показывают, что СЧ-платформа может использоваться в качестве платформы для презентации различных чужеродных антигенов на ее поверхности [31–34].

С применением методов флуоресцентной микроскопии, а также иммуоэлектронной микроскопии было установлено, что чужеродные антигены, а также ферменты и флуоресцентные белки типа зеленого флуоресцентного белка медузы связываются с поверхностью СЧ-платформ. Связанные с поверхностью СЧ чужеродные антигены активно реагируют со специфическими антителами, свидетельствуя о том, что антигенная специфичность этих белков не изменялась после их адсорбции на поверхности СЧ (рис. 2, а, б) [31].

В целом полученные результаты позволили заключить, что СЧ представляют собой универсальные частицы-платформы, адсорбирующие на поверхности различные чужеродные антигены с образованием иммуногенных комплексов. Следовательно, комплексы “СЧ–иммуноген” могут рассматриваться как кандидатные вакцины, формируемые *in vitro*.

Важно заметить, что уровни титров антител к целевым антигенам (БО ХВК) возрастали при смешивании с частицами СЧ-платформы до иммунизации. Обычно этот эффект проявлялся наиболее сильно, если чужеродный антиген был ковалентно связан с поверхностью СЧ-платформ [31]. Полученные результаты свидетельствовали о том, что СЧ-платформы способны стимулировать гуморальный иммунный ответ на введение чужеродных белков, т.е. СЧ-платформы обладают выраженной адъювантной активностью [31].

Брукман с соавт. [35] изучили некоторые биологические свойства СЧ, полученных при термической денатурации ВТМ. Авторы выяснили, что нативные вирионы ВТМ и СЧ одинаково распределяются по организму, при этом вирионы ВТМ циркулируют в организме дольше, чем СЧ. Кроме того, авторы показали, что присутствие СЧ в крови не приводит к гемолизу или свертываемости крови.

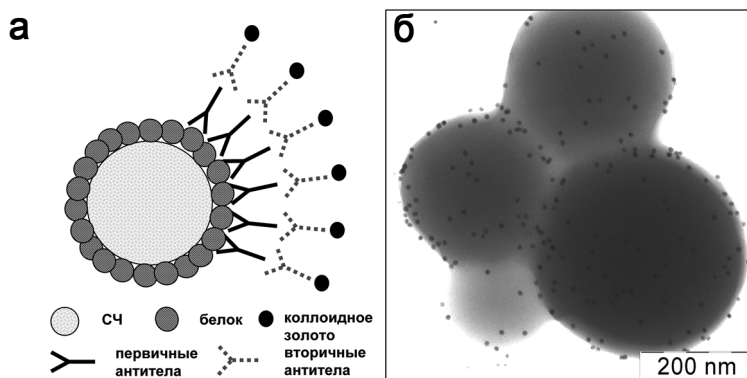


Рис. 2. Схема визуализации посадки рекомбинантных белков на сферическую частицу с помощью метода иммуоэлектронной микроскопии (а); иммуоэлектронная микроскопия композиций СЧ–БО ХВК. В качестве первичных антител были использованы иммуноглобулины к БО ХВК, в качестве вторичных антител — видоспецифичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом (б) [31]

Сборка иммуногенных комплексов из СЧ-платформ и нативных изометрических вирусов

Было показано, что СЧ способны адсорбировать на своей поверхности не только молекулы белков, но и интактные вирионы изометрических вирусов размером от 30 до 50 нм, включая кауловирусы, энтеровирусы, кардиовирусы [36]. Таким образом, установлено, что интактные вирионы разной природы и размеров способны неспецифически адсорбироваться на поверхности СЧ. Архитектура таких комплексов была исследована с помощью сканирующего микроскопа высокого разрешения, было показано, что поверхность СЧ покрыта икосаэдрическими вирионами. Большая часть экспериментов была поставлена с вирусом мозаики цветной капусты (ВМЦК) с диаметром около 50 нм. Были получены два вида комплексов СЧ–ВМЦК: в одном случае икосаэдрический вирус фиксировали на поверхности формальдегидом, в другом формальдегид не добавляли. В отдельной серии экспериментов иммунохимическим методом было показано, что в комплексе СЧ–ВМЦК, стабилизированном формальдегидом, СЧ недоступны для взаимодействия со специфическими антителами, полученными к СЧ, что, по-видимому, связано с тем, что вирионы ВМЦК маскируют поверхность СЧ. В опытах на лабораторных животных было показано, что иммуногенность комплексов СЧ–ВМЦК, обработанных формальдегидом, была невысока и не отличалась от иммуногенности контроля (вирионы ВМЦК). Однако иммуногенность комплексов СЧ–ВМЦК, не фиксированных формальдегидом, была высокой. Можно предположить, что антигенные и адъювантно активные участки СЧ-платформ оказываются экранированы в составе комплексов СЧ с изометрическим вирусом, фиксированным формальдегидом. Отсутствие фиксации формальдегидом несколько дестабилизирует комплекс, частично делая доступными адъювантно активные участки СЧ-платформ и повышая иммуногенность вирусного компонента [36].

Ранее было установлено [28], что иммуногенность СЧ-платформ почти в 20 раз выше иммуногенности нативного ВТМ. Недавно Карпова с соавт. [31] сообщили, что СЧ-платформы, генерируемые при термоденатурации ВТМ, проявляют адъювантную активность при связывании чужеродных антигенов или при смешивании СЧ, или с нативными вирионами [36]. Таким образом, конформационные изменения в белке ВТМ серьезно изменяют адсорбционные свойства СЧ-платформ по сравнению с нативными вирионами.

Композиции, состоящие из СЧ-платформ, на поверхности которых адсорбированы или связаны с поверхностью ковалентно чужеродные белки-иммуногены, потенциально имеют ряд преимуществ

перед аттенуированными, химически инактивированными и субъединичными вакцинами. Этот подход исключает возможность патогенных реверсий и рекомбинаций, так как композиции СЧ-антиген собираются из генетически инертных компонентов. Вакцины, полученные на основе СЧ, будут биологически безопасны, так как человек и сельскохозяйственные животные не имеют общих патогенов с растениями. Важная особенность СЧ-платформ и композиций, полученных на их основе, — стабильность и практически полное отсутствие агрегации суспензии при хранении. Белки различного аминокислотного состава и размеров и даже целые вирионы могут быть использованы для создания комплексов благодаря уникальным адсорбционным свойствам СЧ. Иммуногенность СЧ-платформ почти в 20 раз выше иммуногенности нативного ВТМ, и они обладают высокой адъювантной активностью [28, 31, 36].

Ранее мы предположили, что уникальные свойства СЧ позволят расширить круг областей их применения в нанотехнологиях биологии и техники [37–40]. В соответствии с этим предположением Брукман с соавт. [41] сообщили, что генерируемые ВТМ СЧ, модифицируемые ионами (хелатами) гадолиния, могут применяться в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии. При этом было показано, что у сферических частиц уровень релаксационной релаксации был значительно выше, чем у нативных частиц ВТМ. Другие авторы показали возможность связывания золотых наночастиц диаметром 15 нм на поверхности СЧ [42]. Таким образом, сферические частицы, полученные при термической денатурации ВТМ, имеют большой практический потенциал в области биомедицинских исследований.

Заключение

В настоящей работе основное внимание сосредоточено на характеристике и применении в биотехнологии феномена структурной перестройки спиральных фитовирусов в сферические частицы (СЧ) — платформы нового типа. Размеры СЧ, формируемых при термической структурной перестройке, зависят от исходной концентрации нативного спирального вируса. Уникальная особенность СЧ-платформ — способность неспецифически сорбировать на своей поверхности структурно и функционально различные антигены. СЧ-платформы высоко иммуногенны и обладают выраженной адъювантной активностью. Иммуногенность антигенных детерминант в присутствии СЧ значительно возрастает как в составе комплекса, в котором СЧ ковалентно связаны с антигеном, так и при их простом смешивании. Сборка иммуногенных комплексов СЧ–антиген *in vitro* открывает перспективы недорогого и быстрого получения разнообразных вакцинных препаратов. Частицы

СЧ уникальны, не имеют структурных аналогов среди икосаэдрических вирусов и представляют собой новый тип биогенных платформ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atabekov J.G. Using viral structures as nanotechnology instruments // *Nanotechnologies in Russia*. 2008. Vol. 3. N 1–2. P. 128–137.
2. Lico C., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Baschieri S. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice // *Vaccine*. 2009. Vol. 27. N 37. P. 5069–5076.
3. Acosta-Ramírez E., Pérez-Flores R., Majeau N., Pastelin-Palacios R., Gil-Cruz C., Ramírez-Saldaña M., Manjarrez-Orduño N., Cervantes-Barragán L., Santos-Argumedo L., Flores-Romo L., Becker I., Isibasi A., Leclerc D., López-Macias C. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus // *Immunology*. 2008. Vol. 124. N 2. P. 186–197.
4. Denis J., Acosta-Ramírez E., Zhao Y., Hamelin M.E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Paré C., Lopez Macias C., Boivin G., Leclerc D. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform // *Vaccine*. 2008. Vol. 26. N 27–28. P. 3395–3403.
5. Savard C., Guerin A., Drouin K., Bolduc M., Lalliberte-Gagne M.E., Dumas M.C., Majeau N., Leclerc D. Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 6. e21522.
6. Stubbs G. Tobacco mosaic virus particle structure and initiation of disassembly // *Philos. Trans. R. Soc. London B*. 1999. Vol. 354. N 1383. P. 551–557.
7. Klug A. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly // *Philos. Trans. R. Soc. London B*. 1999. Vol. 354. N 1383. P. 531–535.
8. Werner S., Marillonnet S., Hause D., Klimyuk V., Gleba Y. Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103. N 47. P. 17678–17683.
9. Carette N., Engelkamp H., Akpa E., Pierre S.J., Cameron N.B., Christianen P.C.M., Maan J.C., Thies J.C., Weberskirch R., Rowan A.E., Nolte J.M., Michon T., Van Hest J.C.M. A virus-based biocatalyst // *Nat. Nanotechnol.* 2007. Vol. 2. N 4. P. 226.
10. Porta C., Lomonosoff G. Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2002. Vol. 40. P. 45–74.
11. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection — a new platform for expression recombinant vaccines in plants // *Vaccine*. 2005. Vol. 23. N 17–18. P. 2042–2048.
12. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. Vol. 18. N 2. P. 134–141.
13. Gleba Y., Tusé D., Giritch A. Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium // *Plant Viral Vectors* / Ed. by Palmer K., Gleba Y. Berlin: Springer Verlag Berlin, 2014. P. 155–192.
14. McCormick A., Palmer K. Genetically engineered Tobacco mosaic virus as nanoparticle vaccines // *Expert Rev. Vaccines*. 2008. Vol. 7. N 1. P. 33–41.
15. Lico C., Chen Q., Santi L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants // *J. Cell Physiol.* 2008. Vol. 216. N 2. P. 366–377.
16. Petukhova N., Gasanova T., Stepanova L., Rusova O., Potapchuk M., Korotkov A., Skurat E., Tsybalova L., Kiselev O., Ivanov P., Atabekov J. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by tobacco mosaic virus-based vectors // *Curr. Pharm. Design*. 2013. Vol. 19. N 31. P. 5587–5600.
17. Kapila J., DeRycke R., VanMontagu M., Angenon G. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves // *Plant Sci*. 1997. Vol. 122. N 1. P. 101–108.
18. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter F. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals // *Nat. Biotechnol.* 2000. Vol. 18. N 11. P. 1151–1155.
19. Marusic C., Rizza P., Lattanzi L., Mancini C., Spada M., Belardelli F., Benvenuto E., Capone I. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1 // *J. Virol.* 2001. Vol. 75. N 18. P. 8434–8439.
20. Zelada A.M., Calamante G., de la Paz Santangelo V., Bigi F., Verna F., Mentaberry A., Cataldi F. Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector // *Tuberculosis*. 2006. Vol. 86. N 3–4. P. 263–267.
21. Zvereva A.S., Petrovskaya L.E., Rodina A.V., Frolova O.Y., Ivanov P.A., Shingarova L.N., Komarova T.V., Dorokhov Y.L., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Atabekov J.G. Production of biologically active human myelocytokines in plants // *Biochemistry (Mosc)*. 2009. Vol. 74. N 11. P. 1187–1194.
22. Smith M., Lindbo J., Dillard-Telm S., Brosio P., Lasnik A., McCormick A., Nguyen L., Palmer K. Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications // *Virology*. 2006. Vol. 348. N 2. P. 475–488.
23. Ravin N.V., Kotlyarov R.Y., Mardanov E.S., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Skryabin K.G. Plant-produced recombinant influenza vaccine based on virus-like HbC particles carrying an extracellular domain of M2 protein // *Biochemistry (Mosc)*. 2012. Vol. 77. N 1. P. 33–40.
24. Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HbC virus-like particles // *Virology*. 2013. Vol. 435. N 2. P. 293–300.
25. Skrastina D., Petrovskis I., Petraityte R., Sominskaya I., Ose V., Lieknina I., Bogans J., Sasnauskas K., Pumpens P. Chimeric Derivatives of Hepatitis B Virus Core Particles Carrying Major Epitopes of the Rubella Virus E1 Glycoprotein // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. Vol. 20. N 11. P. 1719–1728.
26. Lauffer M.A., Price W.C. Thermal denaturation of tobacco mosaic virus // *J. Biol. Chem.* 1940. Vol. 133. N 1. P. 1–15.
27. Hart R.G. Morphological changes accompanying thermal denaturation of Tobacco mosaic virus // *Biochim. Biophys. Acta*. 1956. Vol. 20. N 2. P. 388–389.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

28. Atabekov J., Nikitin N., Archipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // J. Gen. Virol. 2011. Vol. 92. N 2. P. 453–456.
29. Dobrov E., Nikitin N., Trifonova E., Parshina E., Makarov V., Maksimov G., Karpova O., Atabekov J. β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. N 5. P. 701–708.
30. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Petrova E.K., Karpova O.V., Atabekov J.G. Spherical virus-like particles generated by thermal denaturation of helical Potato virus X // FEBS J. 2014. Vol. 281. N 1. P. 421–423.
31. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // J. Gen. Virol. 2012. Vol. 93. N 2. P. 400–407.
32. Nikitin N., Malinin A., Rakhnyanskaya A., Trifonova E., Karpova O., Yaroslavov A., Atabekov J. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // Polym. Sci. Ser. A. 2011. Vol. 53. N 11. P. 1026–1031.
33. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by Nanoparticle Tracking Analysis // Microscopy and Microanalysis. 2013. Vol. 19. N 4. P. 808–813.
34. Nikitin N., Malinin A., Trifonova E., Rakhnyanskaya A., Yaroslavov A., Karpova O., Atabekov J. Proteins immobilization on the surface of modified plant viral particles coated with hydrophobic polycations // J. Biomat. Sci. Polym. E. 2014. Vol. 25. N 16. P. 1743–1754.
35. Bruckman M., Randolph L., Meter A., Hern S., Shoffstall A., Taurog R., Steinmetz N. Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice // Virology. 2014. Vol. 449. P. 163–173.
36. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. N 8. P. 1193–1201.
37. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Чирков С.Н. Новый тип частиц-носителей (платформ) для получения активных комплексов // Патент РФ 2441667 от 10.02.2012 г.
38. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Чирков С.Н., Шевелева А.А. Иммуногенная композиция, содержащая чужеродные антигены на поверхности сферических носителей, полученных при термической денатурации спиральных вирусов // Патент РФ 2440140 от 20.01.2012 г.
39. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Чирков С.Н., Шевелева А.А. Способ усиления иммунного ответа // Патент РФ 2442604 от 20.02.2012 г.
40. Atabekov J.G., Arkhipenko M.V., Karpova O.V., Kirpichnikov M.P., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Chirkov S.N., Sheveleva A.A. Spherical nano- and microparticles derived from plant viruses for the display of foreign proteins and epitopes // The Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 2012/078069 A1.
41. Bruckman M., Hern S., Jiang K., Flask C., Yua X., Steinmetz N. Tobacco mosaic virus rods and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents // J. Mater. Chem. B. 2013. Vol. 1. N 10. P. 1482–1490.
42. Shah S., Shah S., Heddle J. Wild-type tobacco mosaic virus (TMV) as a scaffold for gold nanoparticle fabrication // Abstract Book of GOLD2012: The 6th International Conference on Gold Science, Technology and its Applications. Tokyo, 2012. 2P-072.

Поступила в редакцию
08.04.14

NEW TYPE PLATFORMS FOR *IN VITRO* VACCINES ASSEMBLY

J.G. Atabekov, N.A. Nikitin, O.V. Karpova

Studying of plant virions and viral coat proteins structure, and also possibilities of their modification and structural remodeling are extremely important for development of absolutely new approaches to creation of biotechnological products, including health products. Plant viruses have clear advantage for obtaining new functional and biologically active materials, inter alia candidate vaccines, due to the fact that plant viruses are not pathogenic for mammals, including humans. The present review focuses attention on characteristic and applying in biotechnology of spherical particles (SP) — the new type platforms generated by structural remodeling of plant viruses. SPs have no structural analogs among the icosahedral viruses and represent the new type of biogenic platforms. Assembly of immunogenic complexes of SP-antigen *in vitro* opens perspectives of inexpensive and rapidly produced various vaccines.

Key words: helical viruses, spherical particles, platforms, complexes with antigen of interest, immunogenicity, adjuvant properties, review.

Сведения об авторах

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru