

УДК 577.11

ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ БИОКОНЬЮГАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЧАСТИЦ ВТМ И КОНСЕРВАТИВНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГРИППА А*

© 2020 Т.В. Гасанова**, А.А. Королева, Е.В. Скурат, П.А. Иванов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tv.gasanova@gmail.com

Поступила в редакцию 30.09.2019

После доработки 08.11.2019

Принята к публикации 16.11.2019

Получены биоконъюгаты вирион–белок между генетически модифицированными частицами вируса табачной мозаики (ВТМ, *tobacco mosaic virus*, TMV) и рекомбинантным белком, несущим консервативный антиген эпитоп М2е вируса гриппа. Вирусный вектор TMV-*N-lus* был создан на основе генома ВТМ штамма U1 путем внесения остатка реакционно-способного лизина (lys) в *N*-концевую область белка оболочки (БО), экспонированную на поверхности частиц. Растения *Nicotiana benthamiana* инокулировали культурой агробактерии, трансформированной TMV-*N-lus*. Вирионы TMV-*N-lus* были выделены из экстрактов системных листьев. Анализ препарата TMV-*N-lus* с помощью электрофореза в полиакриламидном геле показал наличие белка с подвижностью ~21 кДа. Электронная микроскопия препарата TMV-*N-lus* подтвердила стабильность модифицированных вирусных частиц. Химическое связывание частиц TMV-*N-lus* и М2е-антигена вируса гриппа, экспрессированного в *E. coli*, производили с помощью 5 мМ 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)-карбодимид (EDC) и 1 мМ *N*-гидроксисукцинимид (NHS). Вестерн-блот анализ подтвердил наличие комплексов, образованных рекомбинантным белком и модифицированными частицами TMV-*N-lus*. Диаметр комплексов практически не отличался от исходных вирионов TMV-*N-lus*, но биоконъюгаты образовывали высокоорганизованную и разветвленную сеть с электронно-плотными «зернами». Динамическое рассеяние света продемонстрировало, что одиночные пики, соответствующие комплексам TMV-*N-lus*/DHFR-М2е, были значительно смещены относительно контрольных вирионов TMV-*N-lus*. Косвенный иммуноферментный анализ с использованием TMV- и М2е-специфических антител показал, что комплексы сохраняют стабильность при длительной адсорбции. Полученные результаты позволяют использовать данные биоконъюгаты для совершенствования кандидатных универсальных вакцин против вируса гриппа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биоконъюгация, вирус табачной мозаики (ВТМ), генетическая модификация частиц, грипп А, мультивалентная нановакцина.

DOI: 10.31857/S0320972520020098

В настоящее время грипп А остается одним из самых опасных респираторных заболеваний. Отсутствие иммунитета к новым сезонным и пандемическим штаммам данного вируса является серьезной проблемой, способной приводить к тяжелым патологиям и летальному исходу. К сожалению, ни одна из существующих вакцин не может полностью решить проблему борьбы с заболеваемостью гриппом по причине высокой изменчивости основных поверхностных антигенов вируса [1].

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-282, 30.12.2019.

** Адресат для корреспонденции.

Большинство разрабатываемых подходов к созданию «универсальной» вакцины нацелено на использование различных консервативных белков и пептидов вируса гриппа. Эффективность предполагаемой «универсальной» противогриппозной вакцины, главным образом, зависит от индукции кросс-реактивных Т-клеток [2]. Известно, что подобный иммунитет не способен предотвратить инфекцию, но значительно ослабляет ее развитие. Например, белок нуклеопротеида вируса гриппа (NP) может выявляться на ранних стадиях инфекции на поверхности зараженных клеток, и антитела, индуцированные этим белком, могут обладать нейтрализующей активностью [3].

Открытие антител, реагирующих с консервативными эпитопами стебля гемагглютинина

(stalk domain of HA), стимулировало разработку «универсальной» кандидатной вакцины против вируса гриппа, которая была успешно апробирована в доклинических исследованиях [1].

На куриных эмбрионах было показано, что включение NP в вирусоподобные частицы (ВПЧ) способствовало выработке анти-NP-антител и обеспечивало 100% защиту от летальной дозы гетерологичного штамма вируса гриппа [4]. Другим консервативным белком является матриксный белок M1, который, как и NP, вызывает эффективный Т-клеточный иммунный ответ [4, 5]. Возникновение защиты широкого спектра у мышей и птиц было продемонстрировано при экспрессии полноразмерных генов внутренних белков NP и M1 с помощью адено-, бакуло- и поксвирусных векторных систем [6, 7]. Тетрамер белка M2 образует ионно-трансмембранный канал. На поверхности вирусной частицы расположен консервативный эктодомен данного белка (23 аминокислотных остатка (а.о.), M2e), который также является перспективной мишенью для создания «универсальной» вакцины [8–10]. Вакцины на основе M2e-эпитопа способствуют развитию защиты от вируса гриппа путем антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ или ADCC) через Т-хелперные клетки и естественные киллеры, макрофаги и тучные клетки [2].

Целью данного исследования было изучение конъюгативных комплексов как платформы для усовершенствования «универсальной» субъединичной вакцины против вируса гриппа А за счет экспонирования консервативных антигенов M2e на поверхности частиц вируса табачной мозаики. Предпосылки использования ВТМ, как носителя при создании вакцины, связаны с доказанной эффективностью адъювантных [11] и иммуногенных [12] свойств этих частиц, в том числе для стимулирования устойчивого гуморального и клеточного иммунного ответа [13]. Палочковидные вирионы ВТМ являются перспективной платформой для регулярного экспонирования большого количества (до 2100 копий) эпитопов на поверхности частиц, что обеспечивает весьма эффективную реакцию иммунной системы [13–15]. Мы исследовали возможности применения химической конъюгации для создания устойчивых комплексов частиц ВТМ, содержащих на поверхности реакционноспособный лизин, с консервативным M2e-эпитопом вируса гриппа А. Белок оболочки ВТМ способен к самосборке и подробно охарактеризован с помощью методов рентгеноструктурного анализа. Кроме того, он достаточно устойчив к изменениям pH и температуры. На основе кристаллографических данных было показано, что

каждая субъединица содержит четыре участка, экспонированных наружу и подходящих для клонирования целевых последовательностей. Помимо N- и C-концевых областей, следует упомянуть две петли полипептидной последовательности, расположенные снаружи вириона (59–65 и 152–156 а.о.) [16]. Ранее реакции био-конъюгации на N-конце БО проводили путем создания доступных реакционноспособных остатков, при этом вносили дополнительную аминокислотную последовательность, включающую лизин (K) с реакционноспособной NH₂-группой. Оптимальной оказалась последовательность аланин-аспарагиновая кислота-фенилаланин-лизин (ADFK) [15]. Этот подход позволил получать комплексы стабильных частиц ВТМ, содержащих реакционноспособный лизин, с эпитопами из цитотоксических Т-лимфоцитов, ассоциированных с антигенами меланомы p15e или Trp2. Иммунизация модифицированными частицами, содержащими оба эпитопа меланомы, показало значительно более эффективное стимулирование противораковой защиты по сравнению с применением этих же пептидов по отдельности [13].

Введение реакционноспособного лизина также позволяет биотинилировать капсид. Таким образом, частицы получают способность связываться с целевым белком, конъюгированным со стрептавидином. Фрагмент структурного белка L2 (36 а.о.) папилломавируса собак, расположенный на поверхности подобных частиц, был значительно более иммуногенным по сравнению с аналогичным «свободным» участком L2 [17]. С помощью химических реагентов N-гидроксисукцинимид (NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) можно создавать мультивалентные вакцины с использованием двух и более антигенов, напрямую присоединяя их к генетически модифицированным частицам ВТМ. Было показано, что одновременная иммунизация мышей смесью препаратов частиц ВТМ, несущих белки OmpA, DnaK и Tul4 из *Francisella tularensis*, значительно повышала уровень защитного иммунного ответа против туляремии [18]. Аналогичные результаты были получены для частиц ВТМ, содержащих реакционноспособный лизин и конъюгированных с гемагглютинином [11].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование вектора на основе ВТМ, содержащего реакционноспособный лизин на N-конце белка оболочки. Вставка четырех кодонов, кодирующих аминокислотную последователь-

ность ADFK, была сделана с помощью ПЦР методом перекрывающихся праймеров. «Внешние» праймеры содержали сайты рестрикции для клонирования в промежуточный вектор рА4083, который содержал 3'-концевую часть кДНК ВТМ (сDNA TMV), включая ген белка оболочки (БО). ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия). Для ПЦР использовали (в соответствии с протоколом производителя) Encyclo-polymerase («Евроген», Россия), обладающую экзонуклеазной активностью, которая снижает вероятность «ошибок» при амплификации. Две первоначальные параллельные ПЦР проводили с двумя парами праймеров. Первая пара: Pr Nco-mp-p (ggagggccatggaac) и Pr ADFK-m (tactgtaagctt-gaagtcagccatatttaaacgaatccgattc), вторая пара Pr ADFK-p (gctgactcaagcttactagatcactactccat) и Pr Ara-cr-m (tgggccctaccgggggtaa). В качестве матрицы использовали плазмиду рА4083. Полученные ПЦР продукты были очищены и введены в следующую ПЦР с добавлением концевых праймеров: Pr Nco-mp-p и Pr Ara-cr-m.

Выделенный ПЦР-продукт был обработан рестриктазами NcoI и BstVI и клонирован по этим же сайтам в промежуточный вектор рА4083. Наличие вставки в конструкции рА4083-N_{lys} проверяли секвенированием. Далее из конструкции рА4083-N_{lys} вырезали фрагмент по BamHI/SalI и переносили в бинарный вектор рBIN-TMV-wt, полученный ранее в нашей лаборатории (рис. 1, а). Итоговая конструкция рBIN-TMV-N-lys содержала полноразмерную кДНК ВТМ (сDNA TMV) с последовательностью ADFK-пептида на N-конце гена белка оболочки под контролем транскрипционного промотора гена *Actin 2* из *Arabidopsis thaliana* и терминатора гена нопалинсинтазы (*nos*).

Трансформация клеток *Agrobacterium tumefaciens*. Агробактериальные клетки штамма GV 3101 были трансформированы полученным бинарным вектором рBIN-TMV-N-lys. Все бактериальные культуры выращивали по отдельности в жидкой среде LB с соответствующими антибиотиками при температуре роста бактерий (для *A. tumefaciens* 28 °С) в течение ночи на шейкере (170 качаний/мин). На следующем этапе смешивали по 100 мкл каждой из ночных бактериальных культур и высевали на чашку Петри с агаром без антибиотиков, которую инкубировали при 28 °С в течение ночи. Далее делали серию десятикратных разведений соскоба из выросшего на чашке сплошного газона бактерий и высевали на LB агар с селективными антибиотиками (канамицин 50 мкг/мл, рифампицин 50 мкг/мл, гентамицин 25 мкг/мл), после чего выращивали в течение 48 ч при 28 °С. Колонии *A. tumefaciens*

проверяли с помощью ПЦР, используя следующие праймеры: PrCP-U1-PstI-p(actgctgcaggagtagacgacgcaacgggtggccata), PrCP-U1-HindIII-m (actgaagcttcgcaccacgtgtgaattacggacasaat), PrTad23-p (gggaaaaatagtagtaatgatcggtcagtcgccgaacaagaac), Pr CP-154-m (agaggtccaaaccaaacaccag).

Агроинфильтрация листьев *Nicotiana benthamiana*. Клетки агробактерий с рBIN-TMV-N-lys, а также агробактерии с бинарным вектором, экспрессирующим р19 с антисайленсинговой активностью из вируса карликовой кустистости томатов (*tomato bushy stunt virus*, TBSV), выращивали в течение ночи при 28 °С. Клетки осаждали при 5 000 g 5 мин и ресуспендировали в буфере для агроинфильтрации (10 mM MgSO₄, 10 mM MES, pH 5,6) до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,5. Для агроинфильтрации выбирали листья третьего яруса сверху полуторамесячных растений. Смесь агробактерий инфильтрировали в абаксиальную часть листа с помощью шприца со снятой иглой.

Выделение мутантного вируса. Через две–три недели после инфильтрации листья приобретали признаки заражения вирусом. Инфицированные листья гомогенизировали в блендере в двух объемах 0,1 М Na-P-буфера (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, pH 7,0 и 1%-ный β-меркаптоэтанол (v/v)). Растительный дебрис осаждали на препаративной центрифуге Beckman 10 мин при 13 000 g. Супернатант, содержащий вирус, осветляли с помощью хлороформа (1/4 объема); после интенсивного встряхивания в течение 20 мин препарат снова центрифугировали 10 мин при 13 000 g для разделения фаз. Водную фазу отбирали, добавляли ПЭГ₆₀₀₀ до 4% (w/v), NaCl до 1% (w/v) и высаживали вирус при 4 °С в течение ночи. На следующий день осаждали вирус в течение 10 мин при 13 000 g. Осадок ресуспендировали в 0,01М Na-P-буфере (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, (pH 7,0)). После растворения осадка препарат центрифугировали для осаждения нерастворимых компонентов 5 мин при 5 000 g. Супернатант отбирали для дальнейших исследований.

Выделение РНК из растений *Nicotiana benthamiana*. РНК из 400 мг растительного материала (верхние листья с выраженными симптомами) выделяли по стандартной методике с помощью набора RNeasy Mini-Kit («Qiagen», Германия). РНК элюировали с колонки с помощью воды, свободной от РНКаз из упомянутого набора; количество оценивали спектрофотометрически при OD₂₆₀.

Вестерн-блот анализ. После разделения в градиентном (8–20%) полиакриламидном геле (ПААГ) белки переносили на PVDF мембрану (Hybond-P, «Amersham») в буфере для переноса (25 mM Tris, 0,192 M глицин, этанол 10% (v/v)).

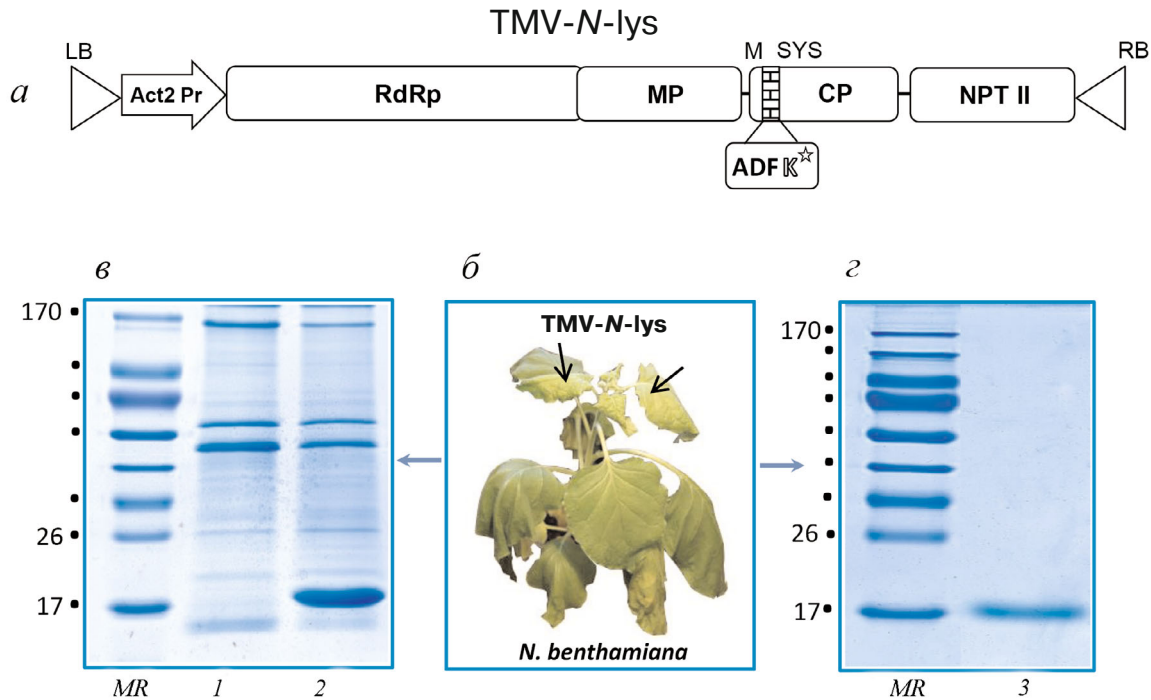


Рис. 1. Конструирование, выделение и очистка генетически модифицированных вирусных частиц. *a* – Схематическое изображение конструкции бинарного вектора pTMV-*N-lys*, полученного путем вставки ADFK в бинарный вектор pTMV-wt на основе плазмиды pBin19. Обозначения: РНК-зависимая РНК-полимераза (TMV-U1); RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase); Act2 – промотер гена *Actin 2* из *Arabidopsis thaliana*; NPT – неомисин phosphotransferase (неомицин фототрансфераза, ген устойчивости к канамицину); LB, RB – левая и правая границы Т-ДНК соответственно (left, right borders); MP – транспортный белок ВТМ, CP – белок оболочки, ADFK – вставка в CP, содержащая реакционно-способный лизин (K); *b* – растение *Nicotiana benthamiana* с системными симптомами, вызванными рекомбинантным вирусом TMV-*N-lys* через 10 дней после инокуляции (д.п.и.); *c* – электрофоретический анализ в градиентном 8–20% полиакриламидном геле (ПААГ) растительных экстрактов из контрольного незараженного (1) и зараженного TMV-*N-lys* растения (2); *d* – электрофоретический анализ в градиентном 8–20% ПААГ очищенных вирусных частиц TMV-*N-lys*; MR – набор белковых маркеров, цифры перед стрелками указывают мол. массы в кДа. Дорожка 3 – TMV-*N-lys*, 10 мкг. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Далее мембраны блокировали 5% (w/v) обезжиренным молоком в течение 1 ч при комнатной температуре в TBS-Tween буфере (TBS-T; 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, Tween 20 0,1% (v/v), pH 8,0). После промывки в TBS-T мембраны инкубировали в том же буфере с 2,5% (w/v) раствором молока, добавляя первичные мышинные антитела к ВТМ (получены на кафедре вирусологии МГУ путем трех внутримышечных иммунизаций по 500 мкг белка на одну инъекцию через двухнедельные интервалы, разведение 1 : 5000) или специфические IgG к ВТМ (SRA 57400/1000, «Agdia», США), а также первичные антитела мыши к М2е-пептиду (получены на кафедре вирусологии МГУ путем трех внутримышечных иммунизаций мышей по 300 мкг белка на одну инъекцию через недельные интервалы с использованием адьюванта, разведение 1 : 20 000 [9]). После трех промывок мембран в буфере TBS-T, каждая по 5 мин, проводили инкубацию со вторичными антимыши-

ными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Sigma») в разведении 1 : 15 000 в течение часа. Последующие промывки проводили в TBS-T 3 раза по 5 мин. Активацию пероксидазы хрена проводили с помощью набора реактивов ECL («Amersham»). Хемилюминисцентный сигнал детектировали на рентгеновской пленке.

Электронная микроскопия. Препараты вируса наносили на металлические сетки с карбоновой пленкой («Ted Pella», США) для электронной микроскопии, затем промывали водой MilliQ и контрастировали подкисленным раствором 2%-ного уранилацетата (w/v).

Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА). Препараты вирусных частиц (TMV-*N-lys*, 200 нг) инкубировали в течение ночи при 4 °С в планшетах («Nunc MaxiSorb», Дания). Для блокировки лунок планшеты инкубировали с раствором PBS-T, содержащим 2%-ный БСА (w/v) (1 ч при комнатной температуре). Далее добавляли первичные мышинные антитела к ВТМ или

к DHFR-M2e в буфере PBS-T при разведении 1 : 15 000 и 1 : 20 000 соответственно; инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Инкубацию со вторичными антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Sigma», разведение 1 : 15 000), проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли раствор субстрата ABTS («MP Biomedicals», Франция) 0,04% (w/v) в 50 mM фосфатно-цитратном буфере, содержащем 0,009% (v/v) перекиси водорода. Оптическую плотность регистрировали при 405 нм спустя 10, 20 и 40 мин [9].

Биоконъюгация рекомбинантных белков и вирусных частиц с помощью EDC/NHS. К очищенному вирусному препарату частиц TMV-*N*-lys в концентрации 10 мкг/мкл добавляли диализованный белок с концентрацией 20 мкг/мкл в 0,1M PBS-буфере. В смесь добавляли последовательно 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (EDC) и *N*-гидроксисукцинимид (NHS) до конечной концентрации 5мM каждого реагента. Реакцию биоконъюгации осуществляли в течение 30 мин при комнатной температуре с последующей инкубацией при 4 °C и энергичном перемешивании в течение 2 ч [19].

Динамическое рассеяние света (DLS). Для установления размера вирусных частиц или их комплексов с белком использовали метод, основанный на измерении гидродинамического диаметра по величине коэффициента диффузии (уравнение Стокса–Энштейна). Проводили по 50 измерений каждой пробы на устройстве Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd», Великобритания) с гелий-неоновым лазером (633 нм) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Обработку измерений осуществляли с помощью встроенного программного обеспечения Dispersion Technology Software (DTS) version 5.10.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование, выделение и очистка генетически модифицированных вирусных частиц, содержащих реакционноспособный лизин. При создании вирусного вектора на основе полноразмерной кДНК ВТМ, содержащей реакционноспособный лизин на *N*-конце белка оболочки (СР), использовали аминокислотную последовательность пептида аланин-аспарагиновая кислота-фенилаланин-лизин (ADFK), которая позволяет экспонировать реакционноспособный лизин (К) на поверхности частиц ВТМ [15]. Нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид ADFK, была оптимизирована для

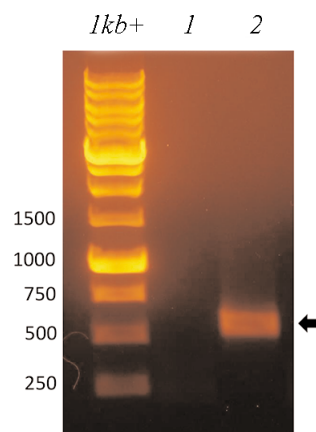


Рис. 2. Электрофоретический анализ в 2%-ном агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР анализа выделенных РНК. MR – маркеры, цифры слева от стрелок указывают молекулярную массу в нуклеотидах (нт). Дорожка 1 – TMV-U1, отрицательный контроль на наличие вставки последовательности ADFK; дорожка 2 – частицы TMV-*N*-lys; наличие полосы размером 600 нт свидетельствует о наличии вставки. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

экспрессии в растениях. Оптимизацию проводили на основе данных о частоте использования различных кодонов у *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* и двух вирусных белков оболочки, которые эффективно накапливаются при инфекции растений вирусами *Tobacco mosaic virus*, TMV-U1 (ВТМ) и *Alternanthera mosaic virus*, AltMV-MU [9]. Для клонирования был выбран компромиссный вариант нуклеотидной последовательности (GCU=A; GAC=D; UUC=F; AAG=K).

Для введения последовательности чужеродного пептида, содержащей *N*-концевой лизин, в ген белка оболочки ВТМ, использовали метод ПЦР с перекрывающимися фрагментами. Сиквенс промежуточного продукта подтвердил последовательность мутантного белка оболочки с *N*-концевой вставкой ADFK. Далее полученный фрагмент СР_{ADFK} встраивали в бинарный вектор рTMV-wt; итоговый вектор рTMV-*N*-lys трансформировали в агробактерию (рис. 1, а). Для анализа стабильности бинарного вектора рTMV-*N*-lys в агробактерии проводили ПЦР-скрининг образовавшихся колоний со специфическими праймерами. Далее двухнедельные растения *Nicotiana benthamiana* были инфильтрованы полученной агробактериальной культурой.

Через 10 дней после инокуляции (10 д.п.и.) наблюдали первые выраженные симптомы в виде желтых хлорозов и скручивания верхних неинокулированных (системных) листьев с последующей деформацией (сгибанием) верхней час-

ти стебля (рис. 1, б). На 14-й день после заражения системные листья были собраны для дальнейшего анализа. Электрофорез белков растительного экстракта показал наличие основной полосы с подвижностью ~21 кДа, отсутствующей в контрольном неинокулированном растении (рис. 1, в). Далее материал из зараженных вектором TMV-*N*-lys листьев использовали для выделения вирусных частиц методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ) с последующей очисткой ультрацентрифугированием и анализом с помощью электрофореза в градиентном ПААГ (рис. 1, г). Было показано наличие единственного белка с электрофоретической подвижностью ~21 кДа, приблизительно соответствующей размеру БО TMV-*N*-lys.

Для подтверждения генетической стабильности полученного вектора и наличия вставки ADFK в геноме рекомбинантного вируса TMV-*N*-lys из препарата очищенных частиц с по-

мощью RNeasy Mini-Kit («Qiagen», Германия) была выделена вирусная РНК. Полученные препараты проверяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя праймеры, специфичные к нуклеотидной последовательности ADFK. В качестве отрицательного контроля использовали частицы ВТМ дикого типа (TMVwt). Анализ продуктов ОТ-ПЦР с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле подтвердил наличие продукта в препарате химерных частиц TMV-*N*-lys и генетическую стабильность вирусного вектора (рис. 2).

Стабильность структуры сформированных химерных вирусных частиц TMV-*N*-lys была проверена с помощью электронной микроскопии (рис. 3, б). Было выявлено, что частицы имеют размеры, сходные с частицами ВТМ дикого типа, однако слегка отличаются от них морфологически за счет менее компактной структуры, приводящей к «изогнутой» геометрии вирионов.

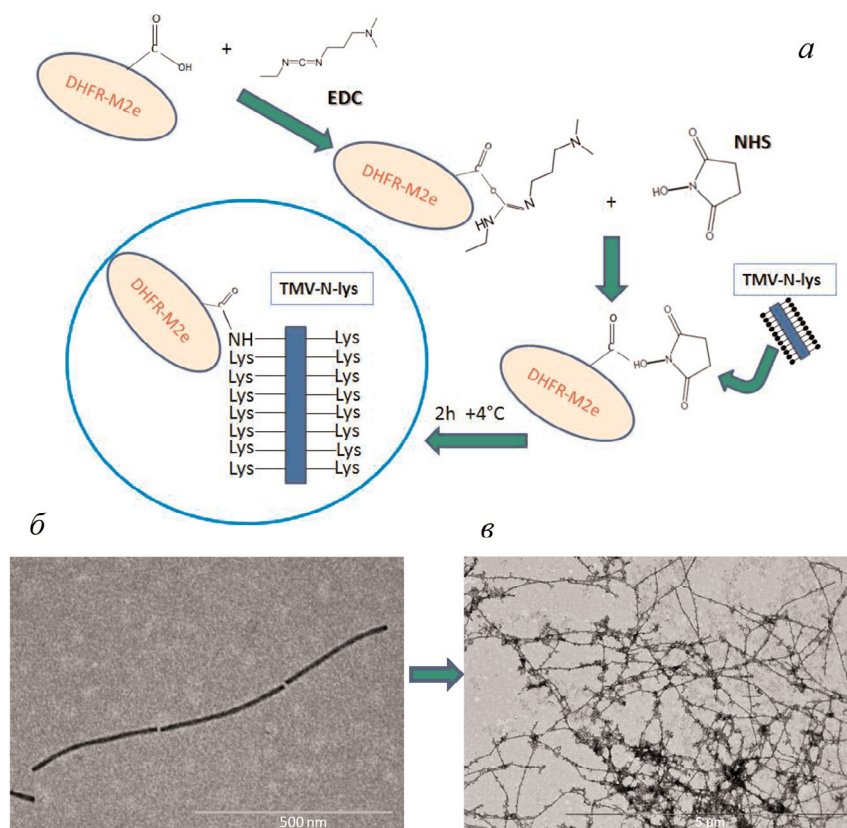


Рис. 3. Получение и характеристика комплексов «вирион–белок». *a* – Схема реакции биоконъюгации частиц TMV-*N*-lys и DHFR-M2e с использованием химических реагентов EDC и NHS; оптимизацию условий проводили с учетом рекомендаций производителя реактива NHS, а также с учетом ранее опубликованной методики [19]; *б* – электронная микрофотография препарата очищенных вирусных частиц TMV-*N*-lys; увеличение в 30 000 раз; масштабная линейка указана в правом нижнем углу; негативное контрастирование с помощью 2%-ного уранилацетата; *в* – электронная микрофотография комплексов «вирион–белок»; увеличение в 10 000 раз; масштабная линейка указана в правом нижнем углу; негативное контрастирование с помощью 2%-ного уранилацетата.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

Характеристика комплексов «вирион–белок».

На следующем этапе проводили химическое связывание частиц TMV-*N*-lys, содержащих реакционноспособный лизин на *N*-конце белка оболочки, и целевого антигена вируса гриппа. Для реакции биоконъюгации использовали очищенные частицы TMV-*N*-lys в концентрации 10 мкг/мкл и белок, содержащий консервативный эпитоп вируса гриппа А. Этот рекомбинантный белок, состоящий из дигидрофолатредуктазы мыши (DHFR), слитой с консервативным эпитопом вируса гриппа М2е (DHFR-М2е) (25,5 кДа), был ранее выделен в нашей лаборатории путем экспрессии в *E. coli* с последующей очисткой на Ni-NTA агарозе [9].

Рекомбинантный белок был диализован против воды (MilliQ) и подвергнут химическим преобразованиям. В отличие от ранее опубликованной работы [18], использованная нами методика предполагает последовательное преобразование свободных COOH-групп рекомбинантных белков в активированный эфир карбоновой кислоты под действием 5 mM *N*-Cyclohexyl-*N*-(2-morpholinoethyl)carbodiimide-metho-*p*-tolue-

nesulfonate, аналога EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), с последующим их преобразованием в NHS-промежуточный эфир под действием 1 mM *N*-hydroxysuccinimide (NHS). В процессе реакции NHS с карбоновой кислотой полученный активированный эфир карбоновой кислоты реагирует с аминогруппой, образуя амид карбоновой кислоты. Аминогруппы представлены *N*-концевыми лизинами на поверхности химерных частиц TMV-*N*-lys. Временные и температурные условия проведения реакции приведены на рис. 3, а. Для выработки наиболее эффективного метода конъюгации проводили серию экспериментов с использованием химических реагентов (EDC, NHS) и буферных растворов. В ходе исследования выяснилось, что наиболее эффективное связывание белка с вирусной частицей происходит в PBS-буфере с одновременным использованием обоих реагентов, EDC и NHS. Полученные комплексы анализировали с помощью электронной микроскопии (рис. 3, в), а также электрофореза в ПААГ.

Комплексы также проверяли с помощью Вестерн-блот анализа для подтверждения того, что высокомолекулярные продукты содержат как частицы TMV-*N*-lys, так и антиген DHFR-М2е. Для этого, после проведения электрофореза комплексов и переноса белков на мембрану PVDF, проводили инкубацию со специфичными сыворотками к белку оболочки ВТМ или к DHFR-М2е, полученными ранее в нашей лаборатории [9]. Наличие высокомолекулярных полос, имеющих приблизительно одинаковую подвижность, подтверждает факт успешной конъюгации белка с вирусной частицей (рис. 4, а, б).

Далее осуществляли дополнительные проверки стабильности комплексов. С помощью метода динамического рассеяния света проводили по 50 измерений каждой пробы с комплексами или контролями. Во избежание негативного влияния гетероцикла NHS реакции конъюгации проводили только с участием EDC и при комнатной температуре в течение ночи. После всех измерений и обработки данных во встроенной компьютерной программе были проанализированы полученные графики (рис. 5). Можно сделать вывод, что при смешивании вирусных частиц с белком без реакции биоконъюгации размер полученных комплексов варьирует в пределах 10–150 нм, а измерение проб с EDC показало сдвиг в высокомолекулярную область, где значения достигали уже ~2000 нм. Для доказательства того, что высокомолекулярные соединения являются продуктами конъюгации вирусных частиц с белком, а не связывания каждого из компонентов с самим

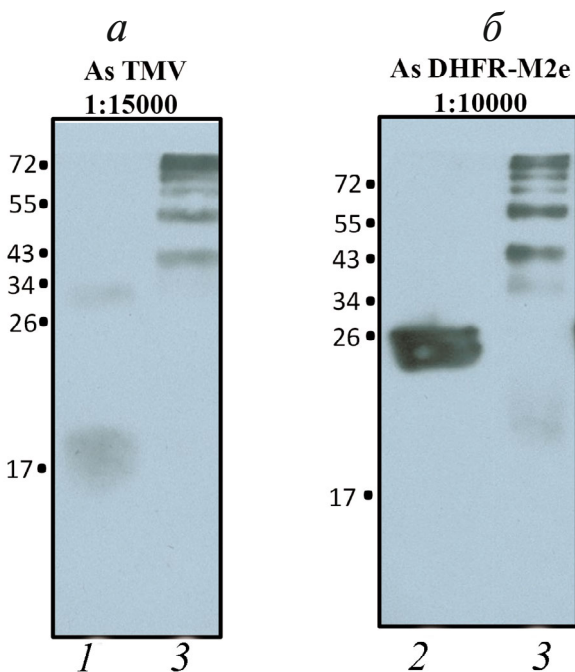


Рис. 4. Характеристика с помощью вестерн-блот анализа комплексов «вирион–белок», полученных при конъюгации белка DHFR-М2е с частицами TMV-*N*-lys. 1 – БО ВТМ (положительный контроль); 2 – рекомбинантный белок DHFR-М2е; 3 – образовавшиеся комплексы TMV-*N*-lys и DHFR-М2е. а – Инкубация мембраны с первичными антителами к ВТМ в разведении 1 : 15 000; б – инкубация мембраны с первичными антителами к DHFR-М2е (1 : 10 000). С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

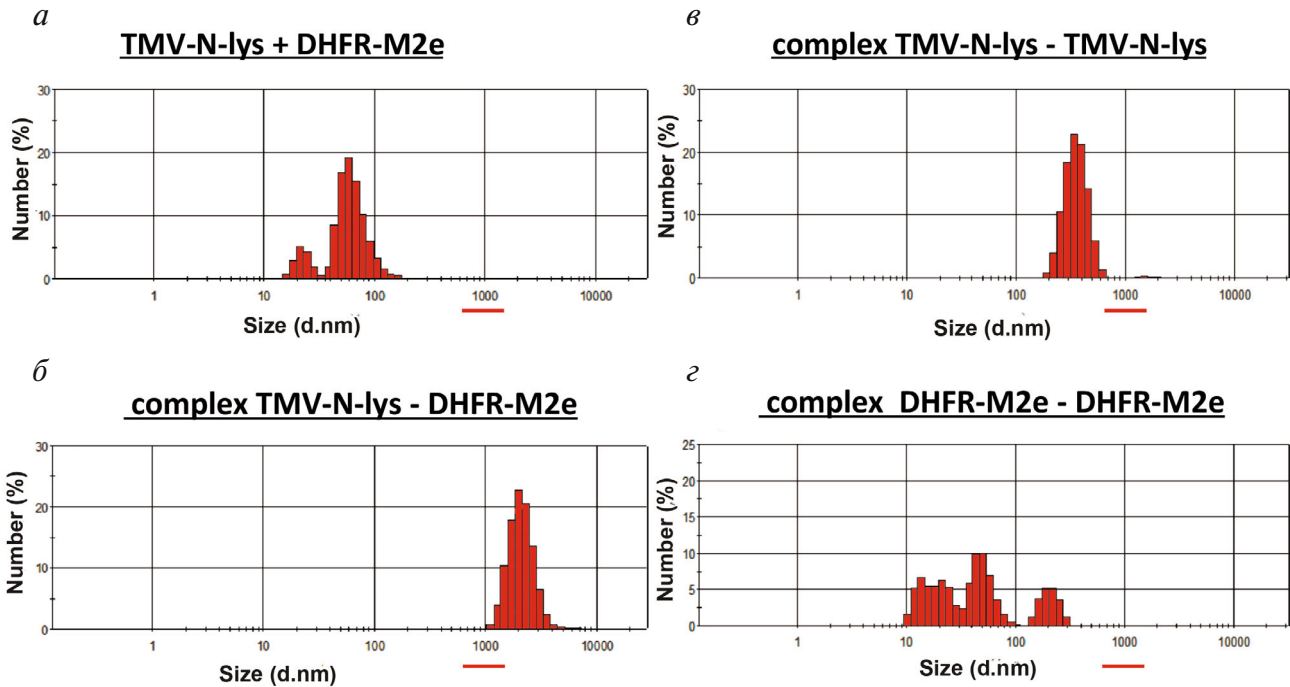


Рис. 5. Характеристика полученных комплексов TMV-*N*-lys с DHFR-M2e с помощью метода динамического рассеяния света. *a* – Смесь частиц TMV-*N*-lys с DHFR-M2e до реакции биоконъюгации; *б* – комплексы частиц TMV-*N*-lys с DHFR-M2e, полученные с помощью биоконъюгации; *в* – отрицательный контроль: комплексы TMV-*N*-lys с частицами TMV-*N*-lys; *г* – отрицательный контроль: комплексы DHFR-M2e с DHFR-M2e.

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

собой, были поставлены контрольные эксперименты. Комплексы TMV-*N*-lys–TMV-*N*-lys имели размеры от 100 до 800 нм (пик в области 350 нм), а в случае DHFR-M2e–DHFR-M2e размеры комплексов не превышали 300 нм. Исходя из этого, можно утверждать, что в результате реакции конъюгации действительно образуются комплексы TMV-*N*-lys–DHFR-M2e, размеры которых существенно отличаются от контролей.

Еще одним доказательством наличия стабильных комплексов стали результаты косвенного (непрямого) иммуноферментного анализа (ИФА). Планшеты с нанесенными в лунки пробами (трехкратные повторы) инкубировали в течение ночи при 4 °С. Последовательность нанесения препаратов отражена на рис. 6. На следующий день к пробам добавляли первичные антитела к ВТМ или DHFR-M2e, дальнейшие действия проводили согласно стандартной методике непрямого иммуноферментного анализа. Использование вторичных антител и субстрата АВТS позволило визуализировать ферментативную реакцию, приводящую к дифференциальному окрашиванию образцов. Для обработки результатов ИФА планшет с пробам подвергали измерениям в микробиологическом

анализаторе («Thermo Scientific», «Multiskan FC») при длине волны 405 нм с интервалами 10, 20 и 40 мин. Статистическая обработка данных показала, что сигнал, соответствующий комплексам TMV-*N*-lys с DHFR-M2e, инкубированным с антителами к ВТМ, был почти в полтора раза слабее, чем в случае смеси этих же частиц с белком без проведения реакции биоконъюгации. Можно предположить, что в результате реакции конъюгации и образования комплексов частицы вируса практически полностью покрываются белком DHFR-M2e, из-за чего связывание антител к ВТМ с вирусными частицами происходит менее эффективно, чем при простом смешивании двух компонентов (вириона и белка). При этом сигнал тех же проб, инкубированных с антителами к DHFR-M2e, был практически идентичен как для комплексов, так и для смеси, что может указывать на равномерное покрытие вирусных частиц белком.

Таким образом, можно утверждать, что структура полученных комплексов вирусных частиц TMV-*N*-lys с экспонированным на поверхности эпитопом М2е вируса гриппа является стабильной; это позволяет использовать данные комплексы для иммунизации животных с дальнейшим совершенствованием существующих кан-

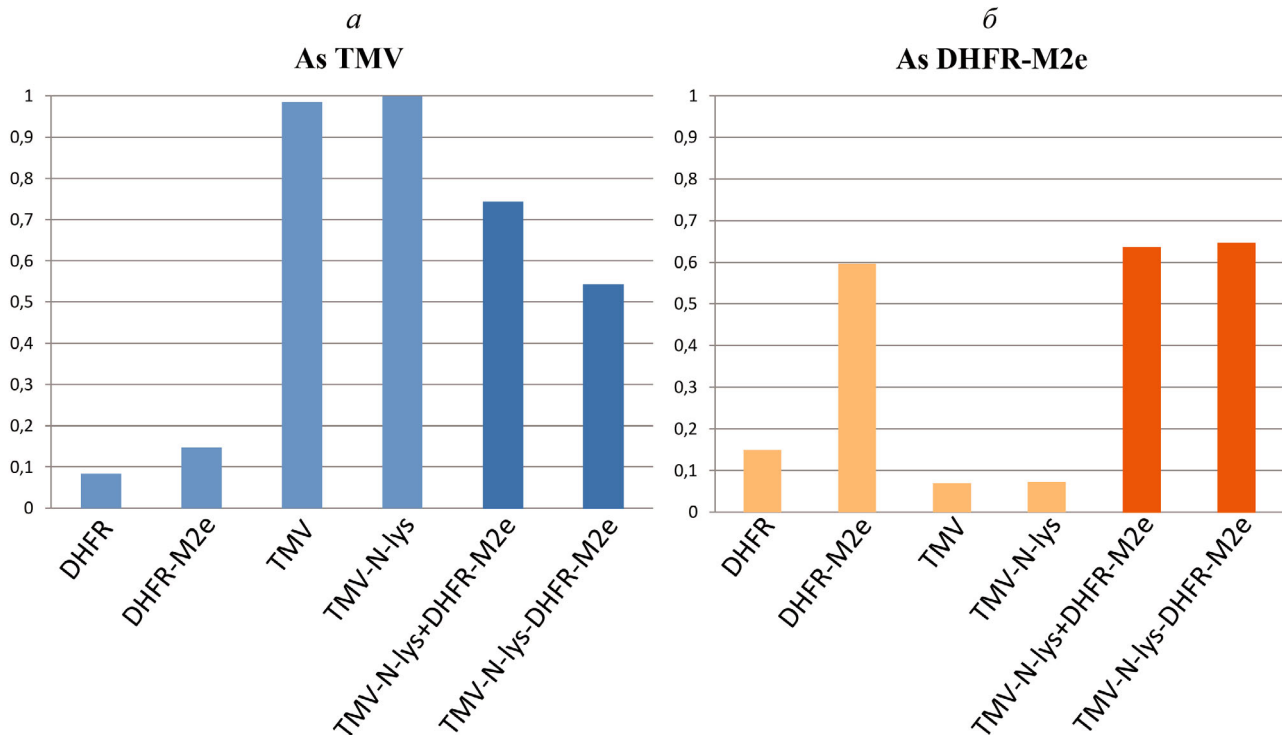


Рис. 6. Характеристика комплексов вирусных частиц TMV-N-lys с белком DHFR-M2e методом непрямого иммуноферментного анализа. Приведены результаты ИФА и статистической обработки данных, полученные в трех независимых экспериментах. *а* – Пробы, инкубированные с антителами к ВТМ; *б* – пробы, инкубированные с антителами к DHFR-M2e; TMV-N-lys + DHFR-M2e – смесь двух компонентов (вирион + белок) в эквимольных количествах. С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

дидатных «универсальных» вакцин против вируса гриппа А [9, 20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время, основываясь на литературных данных, можно с уверенностью говорить о ряде преимуществ использования ВТМ как безопасной платформы для создания мультивалентных вакцин на основе биоконплексов вирион–белок для борьбы с широким спектром заболеваний человека и животных.

Иммуногенные свойства ВТМ дикого типа подробно исследовали на протяжении многих лет [12]. Недавно было доказано, что вирионы ВТМ способны успешно играть роль адъюванта, в том числе, при повторных иммунизациях [11]. Использование частиц ВТМ в качестве носителя антигенных белков и пептидов неизбежно приводит к появлению в крови соответствующих антител. Следует отметить, что упомянутые антитела не являются «мусорными». Согласно данным Liu et al. [21], наличие антител к ВТМ в крови курильщиков коррелирует с пони-

женным риском возникновения болезней Паркинсона и Альцгеймера [21]. Кроме того, присутствие таких антител практически не оказывает влияния на эффективность дальнейшей вакцинации [11]. Таким образом, предполагаемая вакцина на основе биоконплексов вирион–белок является полифункциональной, поскольку антитела против целевого пептида дополняются «полезными» антителами против частицы-носителя.

Форма частиц, применяемых при иммунизации, имеет большое значение. Синтетические полимерные наночастицы мицеллярной формы дольше циркулируют в организме по сравнению с аналогичными сферическими частицами. Предполагают, что данный эффект может быть связан с менее эффективным захватом протяженных частиц мононуклеарными фагоцитами [22]. Аналогичный результат был получен с наночастицами из золота [23]. Иммунизация мышечными частицами ВТМ дикого типа (длина 300 нм) и сферическими частицами (диаметр ~50 нм), полученными при температурной модификации вирионов ВТМ, показала, что выведение сферических частиц из организма происходит заметно

быстрее по сравнению с палочковидными частицами [14].

Очевидно, что рекомбинантные субъединичные вакцины обладают потенциальными преимуществами безопасности по сравнению с инактивированными или живыми ослабленными вакцинами. Текущие исследования по разработке субъединичной вакцины против туляремии выявили ряд антигенов *F. tularensis*, которые способны индуцировать частичный защитный иммунный ответ [24, 25]. Было показано, что протективность вакцин усиливается, когда в их составе используются множественные антигены [26]. Серьезной проблемой при разработке поливалентных субъединичных вакцин остается несовершенство подходов для эффективной доставки таких антигенов через слизистые пути. Напротив, индукция надежного иммунного ответа без использования адъювантов является существенной предпосылкой для внедрения новой стратегии вакцинации с помощью биоконъюгированного ВТМ.

Для определения потенциала создания мультивалентной вакцины применяют два различных подхода: а) создание вакцинных композиций, состоящих из набора всех целевых белков, конъюгированных с одним вирионом ВТМ (моноконъюгатная ВТМ вакцина); или б) использование смеси, состоящей из каждого белка, индивидуально конъюгированного со «своей» частицей ВТМ (поликонъюгатная ВТМ вакцина). Обе вакцинные композиции приводят к образованию антител против всех рекомбинантных белков, при этом процедуры очистки и/или биоконъюгации не изменяют конформацию нативных эпитопов. Сравнение иммунных ответов для моно- и поликонъюгатных композиций показало, что иммобилизация всех белков на одной частице не является оптимальным подходом, а связывание антигенов в эквимольной концентрации с ВТМ обеспечивает эффективную доставку множества антигенов [18]. ВТМ-конъюгатная вакцина является безопасной, и ее можно вводить мышам многократными дозами без каких-либо побочных реакций [27]. Для создания эффективной поликонъюгатной вакцины можно использовать различные консервативные антигены вируса гриппа, в том числе белки

M1 и NP, а также консервативный «стебель» гемагглютинина (НА).

Другой подход к созданию субъединичной поливалентной вакцины может быть связан с комбинированием генетических модификаций и химической конъюгации в рамках одной химерной частицы ВТМ. Для создания химерных частиц на основе генома вируса табачной мозаики чужеродная последовательность клонируется в открытую рамку трансляции гена белка оболочки. Ранее было показано, что такие частицы могут обеспечивать защиту против вирусов гриппа А [9, 20], папилломы [28], ящура [29], а также применяться в противораковой терапии [30, 31]. Например, частицы TMV-M2e-ala и TMV-M2e-ser, созданные ранее в нашей лаборатории, содержали до 90% рекомбинантного белка в очищенных препаратах химерных частиц. При внутрибрюшинной иммунизации мышей соотношение антител, специфичных к эпитопу и носителю, составляло 5 : 1, что свидетельствует об их стабильности в организме животного и значительно превышает показатели, достигнутые ранее (примерно 1 : 1) [30, 32]. Нановакцина TMV-M2e-ala обеспечивала защиту от пяти летальных доз гомологичного и гетерологичного штаммов вируса гриппа А. Для противогриппозных вакцин подобного типа достигнутый показатель протективности является очень высоким. Предполагается, что использование полученных нами и описанных в данной статье конъюгированных комплексов белок–вирион позволит дополнительно повысить эффективность вакцинации за счет генерации мощных моральных и клеточно-опосредованных иммунных ответов. Кроме того, в перспективе возможно использование комбинаций химерных частиц и полученных комплексов в разных соотношениях с целью повышения эффективности мультивалентных «универсальных» вакцин против гриппа [9].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной статье нет исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krammer, F. (2016) Novel universal influenza virus vaccine approaches, *Cur. Opin. Virology*, **17**, 95–103, doi: 10.1016/j.coviro.2016.02.002.
2. Deng, L., Cho, K.J., Fiers, W., and Saelens, X. (2015) M2e-based universal influenza a vaccines, *Vaccines*, **3**, 105–136, doi: 10.3390/vaccines3010105.
3. Virelizier, J.L., Allison, A.C., Oxford, J.S., and Schild, G.C. (1977) Early presence of ribonucleoprotein antigen on surface of influenza virus-infected cells, *Nature*, **266**, 52–54, doi: 10.1038/266052a0.
4. Xue, C., Tian, G., Chen, X., Liu, Q., Ma, J., Xu, S., Li, X., Chen, H., and Cao, Y. (2015) Incorporation of conserved

- nucleoprotein into influenza virus-like particles could provoke a broad protective immune response in BALB/c mice and chickens, *Virus Res.*, **195**, 35–42, doi: 10.1016/j.virus-res.2014.09.018.
5. Gotch, F., McMichael, A., Smith, G., and Moss, B. (1987) Identification of viral molecules recognised by influenza specific human cytotoxic T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **165**, 401–416, doi: 10.1084/jem.165.2.408.
 6. Boyd, A.C., Ruiz-Hernandez, R., Peroval, M.Y., Carsona, C., Balkissoonb, D., Staines, K., Turner, A.V., Hill, A.V.S., Gilbert, S.C., and Butter, C. (2013) Towards a universal vaccine for avian influenza: protective efficacy of modified vaccinia virus Ankara and Adenovirus vaccines expressing conserved influenza antigens in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus, *Vaccine*, **31**, 670–675, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.047.
 7. Pushko, P., Pearce, M.B., Ahmad, A., and Tretyakova, I. (2011) Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes, *Vaccine*, **29**, 5911–5918, doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.068.
 8. Fiers, W., De Filette, M., Bakkouri, K., Schepens, B., Roose, K., Schotsaert, M., Birkett, A., and Saelens, X. (2009) M2e-based universal influenza A vaccine, *Vaccine*, **27**, 6280–6283, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.007.
 9. Petukhova, N.V., Gasanova, T.V., Stepanova, L.A., Rusova, O.A., Potapchuk, M.V., Korotkov, A.V., Skurat, E.V., Tsybalova, L.M., Kiselev, O.I., Ivanov, P.A., and Atabekov, J.G. (2013) Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by tobacco mosaic virus-based vectors, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 5587–5600, doi: 10.2174/13816128113199990337.
 10. Stepanova, L.A., Kotlyarov, R.Y., Kovaleva, A.A., Potapchuk, M.V., Korotkov, A.V., Sergeeva, M.V., Kasianenko, M.A., Kuprianov, V.V., Ravin, N.V., Tsybalova, L.M., Skryabin, K.G., Kiselev, O.I. (2015) Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin, *PLoS One*, **10**, e0119520, doi: 10.1371/journal.pone.0119520.
 11. Mallajosyula, J.K., Hiatt, E., Hume, S., Johnson, A., Jeevan, T., Chikwamba, R., Pogue, G.P., Bratcher, B., Haydon, H., Webby, R.J., and McCormick, A.A. (2014) Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **10**, 586–595, doi: 10.4161/hv.27567.
 12. Van Regenmortel, M.H. (1999) The antigenicity of tobacco mosaic virus, *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **354**, 559–568, doi: 10.1098/rstb.1999.0407.
 13. McCormick, A.A., Corbo, T.A., Wykoff-Clary, S., Palmer, K.E., and Pogue, G.P. (2006) Chemical conjugate TMV-peptide bivalent fusion vaccines improve cellular immunity and tumor protection, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 1330–1338, doi: 10.1021/bc060124m.
 14. Bruckman, M.A., Randolph, L.N., VanMeter, A., Hern, S., Shoffstall, A.J., Taurog, R.E., and Steinmetz, N.F. (2014) Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nanorods and -spheres in mice, *Virology*, **449**, 163–173, doi: 10.1016/j.virol.2013.10.035.
 15. Smith, M.L., Lindbo, J.A., Dillard-Telm, S., Brosio, P.M., Lasnik, A.B., McCormick, A.A., Nguyen, L.V., and Palmer, K.E. (2006) Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications, *Virology*, **348**, 475–488, doi: 10.1016/j.virol.2005.12.039.
 16. Gasanova, T.V., Petukhova, N.V., and Ivanov, P.A. (2016) Chimeric particles of tobacco mosaic virus as a platform for the development of next-generation nanovaccines, *Nanotechnologies in Russia*, **11**, 227–236, doi: 10.1134/S1995078016020051.
 17. Lee, S.Y., Royston, E., Culver, J.N., and Harris, M.T. (2005) Improved metal cluster deposition on a genetically engineered tobacco mosaic virus template, *Nanotechnology*, **16**, 435–441, doi: 10.1088/0957-4484/16/7/019.
 18. Banik, S., Mansour, A.A., Suresh, R.V., Wykoff-Clary, S., Malik, M., McCormick, A.A., and Bakshi, C.S. (2015) Development of a multivalent subunit vaccine against tularemia using tobacco mosaic virus (TMV) based delivery system, *PLoS One*, **10**, e0130858, doi: 10.1371/journal.pone.0130858.
 19. Narain, R. (2014) Chemistry of bioconjugates: synthesis, characterization, and biomedical applications, doi: 10.1002/9781118775882.
 20. Petukhova, N.V., Gasanova, T.V., Ivanov, P.A., and Atabekov, J.G. (2014) High-level systemic expression of conserved influenza epitope in plants on the surface of rod-shaped chimeric particles, *Viruses*, **6**, 1789–1800, doi: 10.3390/v6041789.
 21. Liu, R., Vaishnav, R.A., Roberts, A.M., and Friedland, R.P. (2013) Humans have antibodies against a plant virus: evidence from tobacco mosaic virus, *PLoS One*, **e06621**, doi: 10.1371/journal.pone.0060621.
 22. Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S.S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., and Discher, D.E. (2007) Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat. Nanotechnol.*, **2**, 249–255, doi: 10.1038/nnano.2007.70.
 23. Arnida, Janát-Amsbury M.M., Ray, A., Peterson, C.M., and Ghandehari, H. (2011) Geometry and surface characteristics of gold nano particles influence their biodistribution and uptake by macrophages, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **77**, 417–423, doi: 10.1016/j.ejpb.2010.11.010.
 24. Huntley, J.F., Conley, P.G., Rasko, D.A., Hagman, K.E., Apicella, M.A., and Norgard, M.V. (2008) Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis*, *Infect Immun.*, **76**, 3664–3671, doi: 10.1128/IAI.00374-08.
 25. Apicella, M.A., Post, D.M., Fowler, A.C., Jones, B.D., Rasmussen, J.A., Hunt, J.R., Imagawa, S., Choudhury, B., Inzana, T.J., Maier, T.M., Frank, D.W., Zahrt, T.C., Chaloner, K., Jennings, M.P., McLendon, M.K., and Gibson, B.W. (2010) Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*, *PLoS One*, **5**, e11060, doi: 10.1371/journal.pone.0011060.
 26. Huntley, J.F., Conley, P.G., Hagman, K.E., and Norgard, M.V. (2007) Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins, *J. Bacteriol.*, **189**, 561–574, doi: 10.1128/JB.01505-06.
 27. Mallajosyula, J.K., Jeevan, T., Chikwamba, R., Webby, R.J., and McCormick, A.A. (2016) A single dose TMV-HA vaccine protects mice from H5N1 Influenza challenge, *Intern. J. Vaccine Res.*, **1**, 6, doi: 10.15226/2473-2176/1/2/00106.
 28. Palmer, K.E., Benko, A., Doucette, S.A., Cameron, T.I., Foster, T., Hanley, K.M., McCormick, A.A., McCulloch, M., Pogue, G.P., Smith, M.L., and Christensen, N.D. (2006) Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes, *Vaccine*, **24**, 5516–5525, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.058.
 29. Jiang, L., Li, Q., Li, M., Zhou, Z., Wu, L., Fan, J., Zhang, Q., Zhu, H., and Xu, Z. (2006) A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco, *Vaccine*, **24**, 109–115, doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.060.
 30. Fitchin, J., Beachy, R.N., and Hein, M.B. (1995) Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine

- epitope elicits autoantibody response, *Vaccine*, **13**, 1051–1057, doi: 10.1016/0264-410x(95)00075-c.
31. Frolova, O.Y., Petrunia, I.V., Komarova, T.V., Kosorukov, V.S., Sheval, E.V., Gleba, Y.Y., and Dorokhov, Y.L. (2010) Trastuzumab-binding peptide display by tobacco mosaic virus, *Virology*, **407**, 7–13, doi: 10.1016/j.virol.2010.08.005.
32. Koo, M., Bendahmane, M., Lettieri, G.A., Paoletti, A.D., Lane, T.E., Fitch, J.H., Buchmeier, M.J., and Beachy, R.N. (1999) Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7774–7779, doi: 10.1073/pnas.96.14.7774.

COMPLEXES FORMED *via* BIOCONJUGATION OF GENETICALLY MODIFIED TMV PARTICLES WITH CONSERVED INFLUENZA A VIRUS ANTIGEN: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION*

T. V. Gasanova**, A. A. Koroleva, E. V. Skurat, and P. A. Ivanov

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: tv.gasanova@gmail.com

Received September 30, 2019

Revised November 8, 2019

Accepted November 16, 2019

Genetically modified tobacco mosaic virus (TMV) particles were conjugated with the recombinant protein carrying conserved M2e epitope of influenza A virus. The TMV-*N*-lys viral vector was generated based on the TMV-U1 genome by inserting reactive lysine (lys) residue into the *N*-terminal fragment of the coat protein (CP) displayed on the particle surface. *Nicotiana benthamiana* plants were agroinfiltrated with the agrobacteria transformed with the pBIN-TMV-*N*-lys vector, and TMV-*N*-lys virions were then isolated from the extracts of non-inoculated leaves. Analysis of the TMV-*N*-lys preparations by PAGE demonstrated the presence of a protein with the electrophoretic mobility of ~21 kDa. Electron microscopy of the TMV-*N*-lys preparations confirmed stability of the modified viral particles. TMV-*N*-lys particles were conjugated with the recombinant protein DHFR-M2e containing the M2e antigen of influenza A virus using 5 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and 1 mM *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Formation of complexes between the recombinant protein and modified TMV-*N*-lys particles was confirmed by Western blotting. The diameter of the obtained conjugates was virtually indistinguishable from the diameter of original TMV-*N*-lys virions, but the conjugates formed a highly organized extensive network with electron-dense grains. Dynamic light scattering revealed that the individual peaks corresponding to the TMV-*N*-lys complexes with DHFR-M2e were shifted relative to those of the original TMV-*N*-lys virions. Indirect enzyme immunoassay using TMV- and M2e-specific antibodies demonstrated that the complex was stable during the long-term adsorption. Our results suggest that the obtained virion–protein complex could be used for improving the properties of the universal influenza virus vaccine candidates.

Keywords: bioconjugation, tobacco mosaic virus (TMV), genetically modified particles, influenza A, multivalent nanovaccine