

НАУЧНАЯ СЕССИЯ ОБЩЕГО СОБРАНИЯ ЧЛЕНОВ РАН
“РОЛЬ НАУКИ В ПРЕОДОЛЕНИИ ПАНДЕМИЙ
И ПОСТКРИЗИСНОМ РАЗВИТИИ ОБЩЕСТВА”

ВИРУСЫ РАСТЕНИЙ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ
В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ

© 2022 г. О. В. Карпова^{а,*}, Н. А. Никитин^{а,**}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: okar@genebee.msu.ru

**E-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 26.01.2022 г.

После доработки 10.02.2022 г.

Принята к публикации 05.03.2022 г.

В условиях пандемии актуальной задачей является разработка новых вакцинных платформ, которые позволят бороться с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2, и быстро реагировать на вновь возникающих возбудителей. В решение этого вопроса значительный вклад могут внести вирусы растений. Фитовирусы, обладая свойствами любых вирусных частиц (самосборка, иммуногенность, наноразмеры), абсолютно безопасны для человека, поскольку растения и млекопитающие не имеют общих инфекционных агентов. В результате термической перестройки вируса табачной мозаики получены сферические частицы белковой природы, которые обладают уникальными иммуностимулирующими и адсорбционными свойствами и могут играть роль универсальной платформы-адьюванта для создания вакцин. На основе этих частиц предложена схема получения вакцинных препаратов. Эту технологию можно сравнить с детским конструктором. Основа – сферические частицы, на поверхности которых располагаются “кубики” – антигены. “Кубики” можно убрать, добавить или заменить, и это не займёт много времени и ресурсов. На базе сферических частиц в качестве платформы-адьюванта создан поливалентный вакцинный кандидат против COVID-19.

Ключевые слова: вирусы растений, вирус табачной мозаики, платформа-адьювант, сферические частицы, вакцины, вакцина против SARS-CoV-2.

DOI: 10.31857/S0869587322080072

В настоящий момент совершенно очевидно, что вакцинация – основной способ борьбы с пан-

демией, вызванной вирусом SARS-CoV-2. В нашей стране созданы эффективные вакцины, не уступающие, а может быть, в чём-то и превосходящие зарубежные. При их разработке были использованы ранее полученные и опробованные платформы, которые позволили в рекордные сроки выпустить в гражданский оборот безопасные вакцинные препараты.

Пандемия продолжится, более того, вирусологи уверены, что мы столкнёмся и с другими зоонозными инфекциями, не один раз вирусы преодолеют межвидовой барьер, и человеческая популяция будет бороться с новым инфицирующими агентами. В связи с этим, безусловно, актуальна разработка новых платформ и панелей платформ для создания вакцин, которые позволят быстро реагировать на вызовы и бороться с вновь возникающими инфекциями [1]. В создание вакцинных платформ значительный вклад могут внести вирусы растений. Напомним, что в



КАРПОВА Ольга Вячеславовна – доктор биологических наук, заведующая кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.
НИКИТИН Николай Александрович – доктор биологических наук, профессор кафедры вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

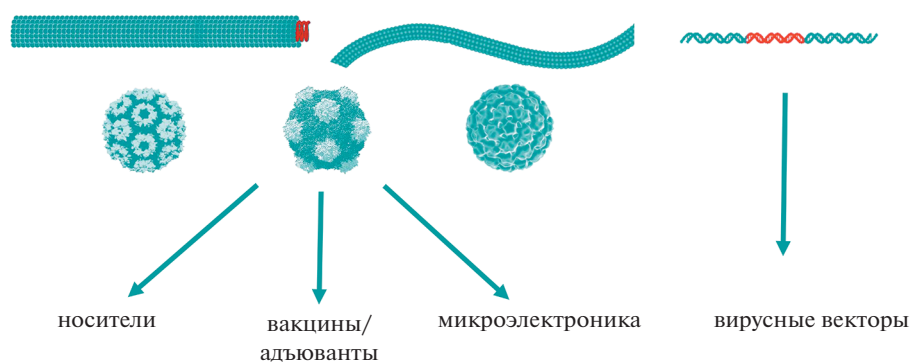


Рис. 1. Основные направления прикладных исследований вирусов растений в области биотехнологии и медицины. Представлены схематические изображения вируса табачной мозаики, Х-вируса картофеля, вируса мозаики костра (PDB: 1JS9), вируса мозаики коровьего горошка (PDB: 1NY7), вируса томатного кустарника (PDB: 2TBV)

нашей стране около 40 лет назад академик И.Г. Атабеков создал школу молекулярной биологии вирусов растений. Она получила международное признание, были получены блестящие научные результаты, посвященные фундаментальному изучению вирусов растений. Также успешно развивались прикладные работы, связанные с борьбой с вирусными инфекциями, наносящими значительный урон сельскому хозяйству.

За последние 10–15 лет ситуация в сфере фитовирусологии кардинально изменилась. Результаты исследований в области молекулярной биологии вирусов растений приобрели большое значение не только для фундаментальной науки и сельского хозяйства, но и для создания новых биотехнологий. Вирусы растений, обладая свойствами всех вирусных частиц (самосборка, имму-

ногенность, наноразмеры), абсолютно безопасны для человека, поскольку растения и млекопитающие не имеют общих инфекционных агентов [2]. Получение очищенных препаратов фитовирусов – процесс крайне малозатратный, так как не требует сложного оборудования, стерильности, культуральных сред и т.д. Кроме того, методики выделения вирусов растений из растительного материала давно и хорошо отработаны, что позволяет получать полностью очищенные препараты, не содержащие никаких примесей. В связи с этим вирусы растений изучаются и применяются в совершенно разных областях биотехнологии. Их используют в качестве носителей для функционально-активных молекул, они становятся базой для вакцин и могут рассматриваться как адьюванты, на их основе делаются микроэлектронные устройства, их используют как вирусные векторы для экспрессии целевых белков в растениях (рис. 1) [3].

Следует отметить, что благодаря научной школе И.Г. Атабекова мы находимся на передовой линии всех этих разработок, и те исследования, которые проводятся в нашей стране являются пионерскими. Конечно же, всё это время одним из объектов исследований был вирус табачной мозаики (ВТМ) – излюбленный объект фитовирусологов, первый вирус, который был обнаружен Д.И. Ивановским в 1892 г. На рисунке 2 представлено классическое изображение ВТМ, полученное с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии. Нами было показано, что если ВТМ нагреть в течение нескольких минут при 94°C, то палочковидный вирион со спиральной структурой диаметром 18 нм и длиной 300 нм превращается в сферические частицы (СЧ), размеры которых можно регулировать в зависимости от исходной концентрации вирусного препарата от 50 до 1000 нм и больше [4]. На рисунке 3 показаны СЧ, сформированные при нагревании до 94°C в течение 10 с вируса табачной

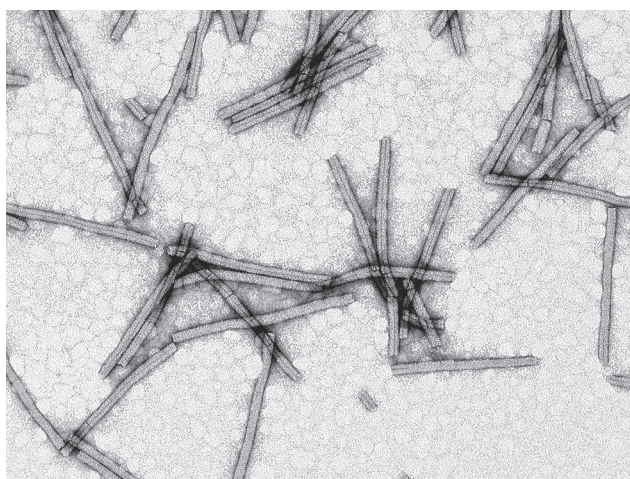


Рис. 2. Микрофотография вируса табачной мозаики. Изображение получено на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова на просвечивающем электронном микроскопе Jem-1011 (Jeol, Япония)

мозаики с начальной концентрацией 1 мг/мл, полученные методом сканирующей электронной микроскопии. В ходе термической перестройки вириона в сферическую частицу геном ВТМ освобождается от белковой оболочки и остаётся в растворе. Поэтому СЧ состоят только из белка оболочки вируса. Анализ ультратонких срезов сферических частиц позволил установить, что они однородны и не имеют полостей внутри [5]. Их плотность составляет 1.43 мг/мл, что значительно отличается от плотности вирионов ВТМ (1.31 мг/мл) [6]. То есть во время термической перестройки белок оболочки ВТМ претерпевает серьёзные конформационные изменения, что приводит к образованию более плотных, чем вирионы ВТМ, сферических частиц. СЧ обладают целым рядом удивительных свойств. Одно из самых важных – способность служить эффективным адъювантом (иммуностимулятором) [7].

Адъюванты активно используются в современной медицинской практике для усиления иммунного ответа организма при вакцинации против инфекционных агентов человека и животных. Адъювантную активность проявляют различные классы соединений, среди них: бактерии, минеральные соли, эмульсии, микрочастицы, небольшие молекулы, сапонины, липосомы. Однако только для некоторых из них удалось получить разрешение на использование в медицинской практике [8]. Основными проблемами адъювантов, используемых на данный момент в производстве вакцин, являются их низкая эффективность, способность негативно влиять на жизнедеятельность организма, затруднение при выведении адъювантных препаратов из организма после вакцинации. В связи с этим создание нового эффективного, биodeградируемого и дешёвого адъюванта – крайне актуальная задача современной молекулярной медицины, вакцинологии и вирусологии. Вирусы растений могут стать многообещающими иммуностимуляторами с такими свойствами. Некоторые особенности структурной организации и размеры фитовирусов позволяют им эффективно стимулировать иммунную систему млекопитающих [9].

Нами впервые проведено сравнительное исследование адъювантных свойств вирусов растений различных форм и размеров, содержащих разный генетический материал. В эксперименте использовались вирус табачной мозаики (палочковидный) и X-вирус картофеля (нитевидный). Оба вируса содержат геном в виде РНК. Их иммуностимулирующие свойства сравнивали с вирусом с икосаэдрическим типом симметрии – вирусом мягкой мозаики фасоли с РНК-геномом и вирусом мозаики цветной капусты, генетический материал которого представлен в виде ДНК [10]. В этих же экспериментах участвовали и сферические частицы, полученные из ВТМ. В качестве

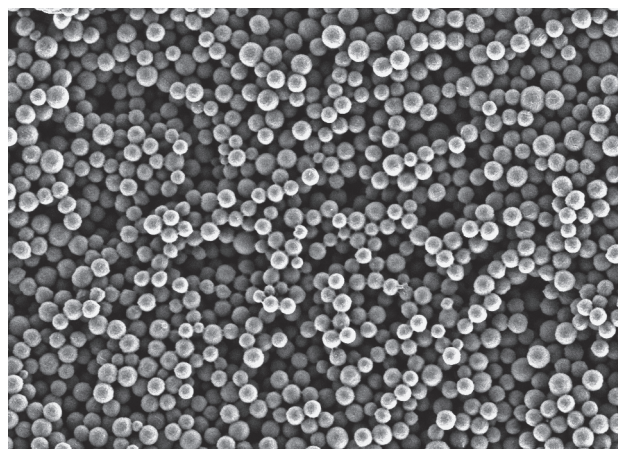


Рис. 3. Сферические частицы, полученные при термической перестройке ВТМ

Изображение получено на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова с использованием сканирующего электронного микроскопа Merlin (Carl Zeiss, Германия)

модельных антигенов использовались овальбумин и лизоцим. Выяснилось, что по крайней мере два вируса из четырёх и СЧ могут работать как эффективные адъюванты, то есть активно стимулируют выработку иммуноглобулинов G (IgG) к целевым белкам по сравнению с титрами IgG у лабораторных животных, иммунизированных только модельными антигенами [10]. Следует отметить, что СЧ в сравнительных экспериментах значительно превосходили по своим иммуностимулирующим свойствам соединения алюминия, которые сейчас активно используются в существующих вакцинах, а также были сравнимы с таким адъювантом, как адъювант Фройнда, который разрешено использовать только в лабораторных условиях [7, 11]. Полученные результаты позволяют утверждать, что вирусы растений и их структурно модифицированные вирионы (сферические частицы) обладают значительными иммуностимулирующими свойствами и потенциально могут стать безопасными, эффективными и дешёвыми адъювантами.

Кроме высоких иммуностимулирующих показателей, сферические частицы обладают ещё рядом особенностей, которые позволяют рассматривать их как многообещающую платформу для создания вакцинных препаратов. СЧ крайне стабильны, их можно повторно нагревать до температуры 94–98°C, замораживать в диапазоне –18––70°C, хранить при 4°C и даже при комнатной температуре в течение более шести месяцев, с ними ничего не происходит: форма, размеры и агрегационное состояние не изменяются. СЧ полностью биобезопасны. В большой серии экспериментов было продемонстрировано отсутствие их токсичности (острой, хронической, репродук-

тивной и иммунотоксичности) на различных видах лабораторных животных [12, 13]. Выше упоминалось, что растения и млекопитающие не имеют общих патогенов, но сферические частицы не содержат и нуклеиновой кислоты — генома вируса, они состоят только из белка оболочки и поэтому не представляют никакой опасности для млекопитающих, прежде всего для человека [4]. В отличие от вирионов ВТМ СЧ биodeградируемы. Показано, что при обработке препарата СЧ в присутствии структурно не модифицированных вирионов ВТМ протеиназой К в поле зрения при анализе просвечивающей электронной микроскопией остаются только частицы ВТМ, а сферические частицы полностью гидролизуются [14].

Важнейшая особенность сферических частиц — их уникальные адсорбционные свойства. На их поверхности за счёт гидрофобных связей и электростатического взаимодействия могут адсорбироваться белки любого размера и аминокислотного состава. В ряде работ с помощью метода иммунофлуоресцентной микроскопии мы продемонстрировали возможность посадки на поверхность СЧ белка оболочки X-вируса картофеля, полиэпистопа гемагглютинина и эпистопа M2 белка вируса гриппа, тетраэпистопа А гликопротеина E1 вируса краснухи, а также рекомбинантного антигена вируса оспы слюны. Все адсорбированные белки сохраняли свою антигенную специфичность и были доступны для взаимодействия с соответствующими антителами в составе комплексов со сферическими частицами [7]. Помимо индивидуальных белков на поверхности СЧ могут быть адсорбированы целые вирионы небольших простых икосаэдрических вирусов (диаметром 26–50 нм) — инфекционных агентов человека, сельскохозяйственных животных и растений [15]. Более того, именно на эти целевые белки или полноразмерные вирионы вырабатывается эффективный иммунный ответ при использовании комплексов “СЧ — целевой белок (вирион)” в качестве вакцинных кандидатов.

После проведения первых экспериментов по оценке иммуногенности таких комплексов на лабораторных животных стало очевидно, что образование комплекса с СЧ не только не препятствует выработке антител к целевому антигену, но и повышает эффективность иммунного ответа по сравнению с иммунизацией тем же антигеном без СЧ. То есть сферические частицы не только выступают платформой для презентации целевых белков-антигенов, но и обладают свойствами эффективного адьюванта. Это означает, что СЧ способны усиливать выработку антител на белки-антигены вне зависимости от их структуры, размера и происхождения. Важно отметить, что во всех исследованиях с использованием значительного количества разнообразных антигенов иммунный ответ на них в составе комплекса с СЧ был выше

по сравнению с иммунным ответом на соответствующие индивидуальные антигены. Мы предполагаем, что постепенная диссоциация антигенов с поверхности СЧ, вероятно выполняющих роль депо целевых белков, может усиливать стимуляцию иммунного ответа [15].

Кроме того, проведена работа по сравнению количества антител, вырабатываемых на антиген и СЧ при иммунизации композициями “СЧ—антиген”. Оказалось, что иммунный ответ на целевой антиген в 6–40 раз выше в зависимости от вида антигена, то есть сферические частицы активируют иммунный ответ именно на антиген, находящийся в композиции с ними, а не на собственный белок [10, 11]. Ввиду того, что СЧ являются адьювантом белковой природы, способность индуцировать выработку более высокого титра антител на целевой антиген, а не на адьювант — важное свойство, которое обуславливает особую привлекательность их использования в качестве универсальной платформы-адьюванта.

На основании свойств сферических частиц нами была создана схема получения вакцинного кандидата (рис. 4). Предложенный подход полностью универсален. Используя эту технологию, можно создать вакцину против практически любого патогена человека вирусной или бактериальной природы. Схема получения вакцинного кандидата достаточно проста. Специально выращенные листья табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*) механически заражают ВТМ, после инкубации в течение приблизительно трёх недель листья собирают и замораживают. Из заражённого растительного материала методом дифференциального центрифугирования выделяют очищенный препарат вируса табачной мозаики. Для получения СЧ исходный препарат вируса с заданной концентрацией инкубируют в термостате при 94°C в течение 5 мин. В результате образуются сферические частицы контролируемого размера. Параллельно с помощью генно-инженерных подходов создаётся генетическая конструкция рекомбинантного белка — целевого антигена. Экспрессия генетической конструкции может происходить в клетках любой природы. На рисунке 4 представлена экспрессия антигенов в бактериальных клетках кишечной палочки (*Escherichia coli*). При инкубации антигены за счёт уникальных адсорбционных свойств сферических частиц располагаются на их поверхности. В итоге мы получаем практически готовый вакцинный кандидат. Кроме того, нами была показана возможность одновременной посадки на поверхность СЧ трёх и более антигенов, что свидетельствует о перспективе создания поливалентных вакцин на основе сферических частиц [7, 16]. Предложенную технологию можно сравнить с детским конструктором. Есть основа — сферические частицы, на поверхности которых распола-

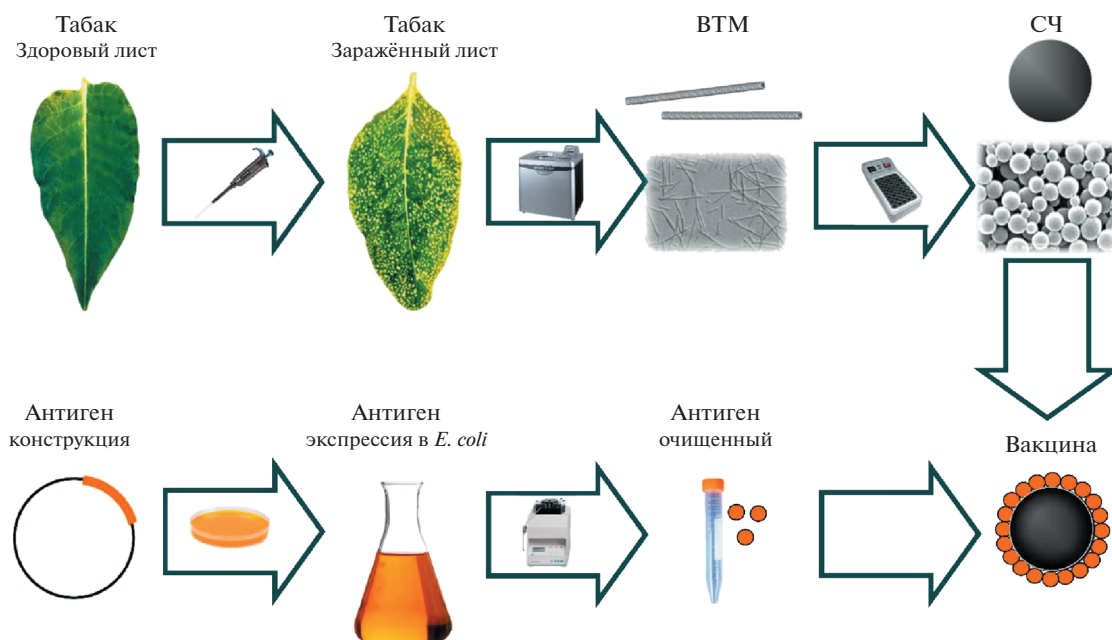


Рис. 4. Схема получения вакцинного кандидата на основе структурно модифицированного вируса табачной мозаики

гаются “кубики”-антигены. Их можно убрать, добавить или заменить, не затрачивая много времени и ресурсов.

На основе структурно модифицированного вируса табачной мозаики (СЧ) мы создали несколько прототипов вакцинных кандидатов против различных инфекций как вирусной, так и бактериальной природы (см. табл.), а также образцы кандидатных вакцин против ротавирусной инфекции человека, сибирской язвы, птичьего гриппа и др. Вакцинный кандидат против вируса краснухи на основе сферических частиц для женщин репродуктивного возраста, детей и людей с иммунодефицитом уже успешно прошёл доклинические испытания. С помощью метода иммуноэлектронной микроскопии, используя поликлональную сыворотку, полученную против вирионов краснухи, и частицы золота, конъюгированные со вторичными антителами в качестве маркера, мы увидели архитектуру комплекса “СЧ – антиген краснухи”. Оказалось, что в этом случае практически имитируется вирион вируса краснухи. Антиген регулярно покрывает поверхность СЧ так же, как поверхностный гликопротеид Е (основной антиген вируса краснухи) располагается на поверхности вириона [11]. Только вакцинный кандидат на основе СЧ абсолютно безопасен и неерактогенен по сравнению с аттенуированной вакциной, содержащей частицы вируса краснухи, кроме того, цена аттенуированной вакцины несравнимо выше.

В условиях пандемии, имея определённый опыт создания вакцинных кандидатов, мы начали работать над созданием вакцины против

COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. На основе сферических частиц в качестве платформы-адьюванта создан поливалентный вакцинный препарат: три рекомбинантных антигена, включающие RBD-домен и консервативные эпитопы из S1 и S2 доменов S-белка, одновременно адсорбированы на СЧ. Одним из этих антигенов является консервативная аминокислотная последовательность, общая для ряда бетакоронавирусов. Такой подход, возможно, позволит заранее получать вакцинный препарат для борьбы с теми коронавирусами, которые в будущем могут перейти межвидовой барьер. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии продемон-

Таблица 1. Образцы кандидатных вакцин, созданные на основе структурно модифицированного вируса табачной мозаики (СЧ)

Инфекция	Антиген	Ссылка
Краснуха	Эпитоп А4	[11]
Грипп птиц	Белки HA и M2e	[16]
Ротавирусная инфекция	Эпитоп RV14 белка VP6	[17]
Хантавирусная инфекция	Инактивированный вирус Пуумала	[18]
COVID-19	Антигены Co1, CoF и PE	[19]
Сибирская язва	Белок PA	[20]
Бешенство	Инактивированный вирус бешенства	[21]

стрировано, что на поверхности сферических частиц адсорбируются все три антигена [19]. Все антигены на поверхности СЧ легко заменить на другие, отличные по аминокислотному составу. Также можно изменить количество антигенов на поверхности СЧ. Такие корректировки могут быть внесены в вакцинный препарат в короткие сроки в зависимости от эпидемической ситуации: появления новых штаммов SARS-CoV-2 или в случае перехода межвидового барьера другими бетакоронавирусами.

В настоящее время показана высокая иммуногенность таких комплексов и вируснейтрализующая активность сывороток животных, иммунизированных вакцинным кандидатом. Эксперименты проводились на мышах и хомяках, на этих же животных получены предварительные результаты по биобезопасности препарата [19]. Сейчас ведётся подготовка к исследованию вакцины на приматах. Всемирная организация здравоохранения внесла вакцинный кандидат против SARS-CoV-2 на основе вирусов растений в список перспективных [22].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-60006 и № 20-016-00063).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Trovato M., Sartorius R., D'Apice L. et al.* Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies // *Frontiers in Immunology*. 2020. V. 11. № 2130. P. 1–20.
2. *Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Карпова О.В., Атабеков И.Г.* Биобезопасность вирусов растений для человека и животных // *Вестник Московского университета. Серия 16 "Биология"*. 2016. № 3. С. 20–26.
3. *Venkataraman S., Hefferon K.* Application of Plant Viruses in Biotechnology, Medicine, and Human Health // *Viruses*. 2021. V. 13. № 1697. P. 1–21.
4. *Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M. et al.* Thermal transition of native TMV and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *Journal of General Virology*. 2011. V. 92. № 2. P. 453–456.
5. *Трифопова Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П. и др.* Способ получения и характеристика сферических частиц – новых биогенных платформ // *Вестник Московского университета. Серия 16 "Биология"*. 2015. № 4. С. 46–50.
6. *Dobrov E., Nikitin N., Trifonova E. et al.* β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2014. V. 32. № 5. P. 701–708.
7. *Карпова О., Никитин Н., Чирков С. et al.* Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // *Journal of General Virology*. 2012. V. 93. № 2. P. 400–407.
8. *Pulendran B., Arunachalam P.S., O'Hagan D.T.* Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021. V. 20. P. 454–475.
9. *Lebel M.-È., Chartrand K., Leclerc D., Lamarre A.* Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants // *Vaccines*. 2015. V. 3. № 3. P. 620–637.
10. *Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Nikitin N.A. et al.* Plant virus particles with various shapes as potential adjuvants // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. № 10365. P. 1–10.
11. *Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A. et al.* Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral Research*. 2017. V. 144. P. 27–33.
12. *Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A. et al.* Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018. V. 97. P. 127–133.
13. *Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A. et al.* Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment // *Data in Brief*. V. 21. P. 1504–1507.
14. *Никитин Н.А., Малинин А.С., Рахнянская А.А. и др.* Использование поликатионного спейсера для нековалентной иммобилизации альбумина на термически модифицированных вирусных частицах // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 2011. № 11. С. 1885–1891.
15. *Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A. et al.* Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2014. № 8. P. 1193–1201.
16. *Кондакова О.А., Трифонова Е.А., Архипенко М.В. и др.* Разработка вакцины против птичьего гриппа на основе структурно модифицированных вирусов растений // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. № 4. С. 731–738.
17. *Рябчевская Е.М., Евтушенко Е.А., Архипенко М.В. и др.* Новый подход к разработке кандидатной вакцины против ротавируса на основе двух вирусов растений // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. № 5. С. 1004–1017.
18. *Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K. et al.* Various Adjuvants Effect on Immunogenicity of Puumala Virus Vaccine // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020. V. 10. № 545371. P. 1–10.
19. *Kovalenko A.O., Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A. et al.* Vaccine candidate against COVID-19 based on structurally modified plant virus as an adjuvant // *Frontiers in Microbiology*. 2022 (In print).
20. *Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Granovskiy D.L. et al.* Two approaches for the stabilization of Bacillus anthracis recombinant protective antigen // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2020. № 2. P. 560–565.
21. *Nikitin N.A., Matveeva I.N., Trifonova E.A. et al.* Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine // *Data in Brief*. 2018. V. 21. P. 742–745.
22. World Health Organization. COVID-19 vaccine tracker and landscape. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (дата обращения 25.01.2022).