

Урываев Л.В.<sup>1</sup>, Альховский С.В.<sup>1</sup>, Самохвалов Е.И.<sup>1</sup>, Беляев А.М.<sup>1</sup>, Бурцева Е.И.<sup>1</sup>, Воркунова Г.К.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>, Гущина Е.А.<sup>1</sup>, Забережный А.Д.<sup>1</sup>, Иванова В.Т.<sup>1</sup>, Иванова М.В.<sup>1</sup>, Ионова К.С.<sup>1</sup>, Латышев О.Е.<sup>1</sup>, Манькин А.А.<sup>1</sup>, Носик Д.Н.<sup>1</sup>, Парасюк Н.А.<sup>1</sup>, Алипер Т.И.<sup>1</sup>, Зверев В.В.<sup>2</sup>, Львов Д.К.<sup>1</sup>

## Вирусы как объекты и инструменты нанобиотехнологий

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Министерства здравоохранения РФ;

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН

---

Приведены современные данные о применении вирусов в качестве эффективных инструментов в нанобиотехнологии и наномедицине. Вирусы разных семейств с любым типом строения вириона и разным типом симметрии нуклеокапсида рассматриваются как нанобиочастицы, построенные из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и нескольких видов многократно повторяющихся белковых молекул, формирующихся путём самосборки в правильно упорядоченные структуры и даже кристаллы. С помощью генетических, химических и молекулярно-биологических методов модификации вирусы и вирусоподобные частицы (ВПЧ – лишены генетического материала) используются для разработки новых генетических (в том числе – рекомбинантных) векторов, адресной доставки лекарственных препаратов в клетки-мишени, создания кандидатных вакцин, новых средств лечения инфекционных и соматических заболеваний, принципиально новых методов диагностики. Особо привлекательны морфологическая однородность структурных компонентов вирионов, биодоступность, биodeградация и мультифункциональные характеристики белков. Наноконъюгаты вирусов (и ВПЧ) с химическими соединениями и/или металлами применяются для фундаментальных исследований в различных сферах нанотехнологий, включая электронику. В обзоре обозначены некоторые направления исследований ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» в области нанобиотехнологии (биочипы, латексные частицы, рекомбинантные вирусы-химеры, сорбенты вирусов на основе полианилина и наноалмазов и др.).

---

Ключевые слова: *вирусы, вирусоподобные частицы, векторы, адресная доставка, наноконъюгаты, биосорбенты, нанобиотехнологии.*

Uryvaev L.V.<sup>1</sup>, Alkhovsky S.V.<sup>1</sup>, Samokhvalov E.I.<sup>1</sup>, Belyaev A.M.<sup>1</sup>, Burtzeva E.I.<sup>1</sup>, Vorkunova G.K.<sup>1</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1</sup>, Gushina E.A.<sup>1</sup>, Zaberezhny A.D.<sup>1</sup>, Ivanova V.T.<sup>1</sup>, Ivanova M.V.<sup>1</sup>, Ionova K.S.<sup>1</sup>, Latyshchev O.E.<sup>1</sup>, Manykin A.A.<sup>1</sup>, Nosik D.N.<sup>1</sup>, Parasjuk N.A.<sup>1</sup>, Aliper T.I.<sup>1</sup>, Zverev V.V.<sup>2</sup>, Lvov D.K.<sup>1</sup>

## Viruses as objects and instruments in nanobiotechnology

<sup>1</sup> D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Ministry of public health;

<sup>2</sup> I.I. Mechnikov Institute of vaccines and sera, Russian academy of medical sciences

---

**Virus particles are typically consisted of several hundreds to thousands of protein molecules, which self-assembled to form hollow scaffold containing the viral nucleic acid (RNA or DNA). They ranged in sizes from ~ 10 nm to over a micron and can be found in variety of distinctive shapes (icosahedrons, spheres, rods). As an emerging and important nanocarrier platform, viruses and virus-like particles (VLP) offer the great advantages of morphological uniformity, biocompatibility and polyfunctionality. In recent years, viruses and VLPs are tailorable at the genetic level for application as reagents, catalysts and scaffolds for chemical reactions, effective vectors for targeted drug delivery and suitable platform for candidate vaccine constructions. This review describes approaches to use viruses in different spheres of nanotechnology and nanomedicine for the next generation therapeutics and imaging devices, as nanocomposites with chemical compounds and metals for new diagnostic methods and even in electronics. Several examples in nanobiomedicine researches at D.I. Ivanovsky Institute of Virology (new diagnostic biochips for influenza A subtypes differentiation, latex-agglutination method for HCV antibodies detection, atomic force microscopy in clinics, TMV recombinants expressing influenza HA antigenic epitopes, polyanilin and nanodiamonds as effective biosorbents) are mentioned as promissive for future development.**

---

Key words: *viruses, virus-like particles, vectors, drug delivery, bioconjugation, targeting, biosorbents, nanobiotechnology, nanomedicine.*

120 лет назад, в 1892 г., русский ученый-ботаник Д.И. Ивановский на основании изучения этиологии болезни табачной мозаики дал определение вирусу как перевиваемой путем последовательных пассажей на растениях *корпускулярной* биологической структуре, отличающейся от растворимых ядов биологического происхождения и токсических соединений [5]. В диссертации «О мозаичной болезни табака» он установил три факта огромной важности: фильтруемость, инфекционность и корпускулярную природу вирусов. В 1935 г. американскому вирусологу В.М. Стенли удалось получить кристаллы ВТМ. В 1936 г. ему была присуждена Нобелевская премия, а работа вызвала широкие дискуссии о природе вирусов. Позже вирусы были охарактеризованы как более мелкие, чем бактерии, неклеточные элементы живой материи, содержащие генетическую информацию (в виде РНК или ДНК), заключенную в белковый чехол, покоящиеся вне клетки и способные к самовоспроизведению (размножению, репродукции) только в живой клетке, обладающие изменчивостью и наследственностью [2]. Было отмечено, что главной особенностью вирусов является их тесная связь с генетическим и метаболическим аппаратами клетки-хозяина.

Современная классификация вирусов основана на определении типа геномной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК, одно- или двухнитевая, положительной или отрицательной полярности, линейная непрерывная или сегментированная, циркулярно-замкнутая и т.д.), морфологии вириона, типе симметрии нуклеокапсида, стратегии репликации генома, биологических характеристиках вируса и клинической картине заболевания. IX сообщение Международного Комитета по Таксономии вирусов (ICTV, 2011) включает описание 2 284 вирусов (и близко стоящих к ним вирионов), распределенных в 349 родов, 19 подсемейств, 87 семейств и 6 порядков. К числу вирусов отнесены и дефектные вирусы, существующие как отдельные виды.

Среди наиболее крупных известны ДНК-вирусы бактерий (*Bac. Megaterium phage* – 670 kbp), микроводорослей (*Pyrantimomas-specific virus* – 560 kbp) и амёб (*Mimivirus* – 670 kbp). Мимивирусы были обнаружены только в 2003 г., а их некоторые гены подобны

генам фикодавирусов и поксвирусов. Их геном содержит более 900 ORF, т.е. их число превышает число ORF в некоторых свободно живущих клетках, а 80 % ORF – уникальны для вирусов. Эти вирусы настолько велики, что даже не проходят через крупные поры величиной 0.2 мкм. Если бы Д.И. Ивановский начал свои исследования с мимивирусов, он не смог бы отфильтровать их после разрушения амёб. Общее число вирусов в биосфере точно подсчитать довольно трудно. Некоторые авторы называют число  $10^{31}$  [33].

Клетки человека содержат примерно 60 000 генов, *E. coli* – 4 000 генов, семейство поксвирусов 200–230, мимивирусы 670–690 генов, некоторые хвостатые ДНК-фаги - до 750. Считается, что минимальное число генов у самого простого живого организма равно примерно 500. РНК-содержащие вирусы содержат 5–15 генов, длина геномной РНК тоже меньше: 4–35 kb, а у вириодов – около 250 b. Это вызвано более низкой стабильностью РНК во внешней среде. Вероятно, поэтому эволюционно более длинные РНК-геномы не закрепились в процессе макроэволюции.

Диаметр вирионов большинства вирусов укладывается в «масштабы» наноструктур (рис. 1). Величина генома в ряде случаев определяет генетическую емкость вируса - способность включать и экспрессировать определенный объем чужеродной генетической информации (вирусы-рекомбинанты с встроенной в структуру генома генетической информацией клетки в виде РНК или ДНК).

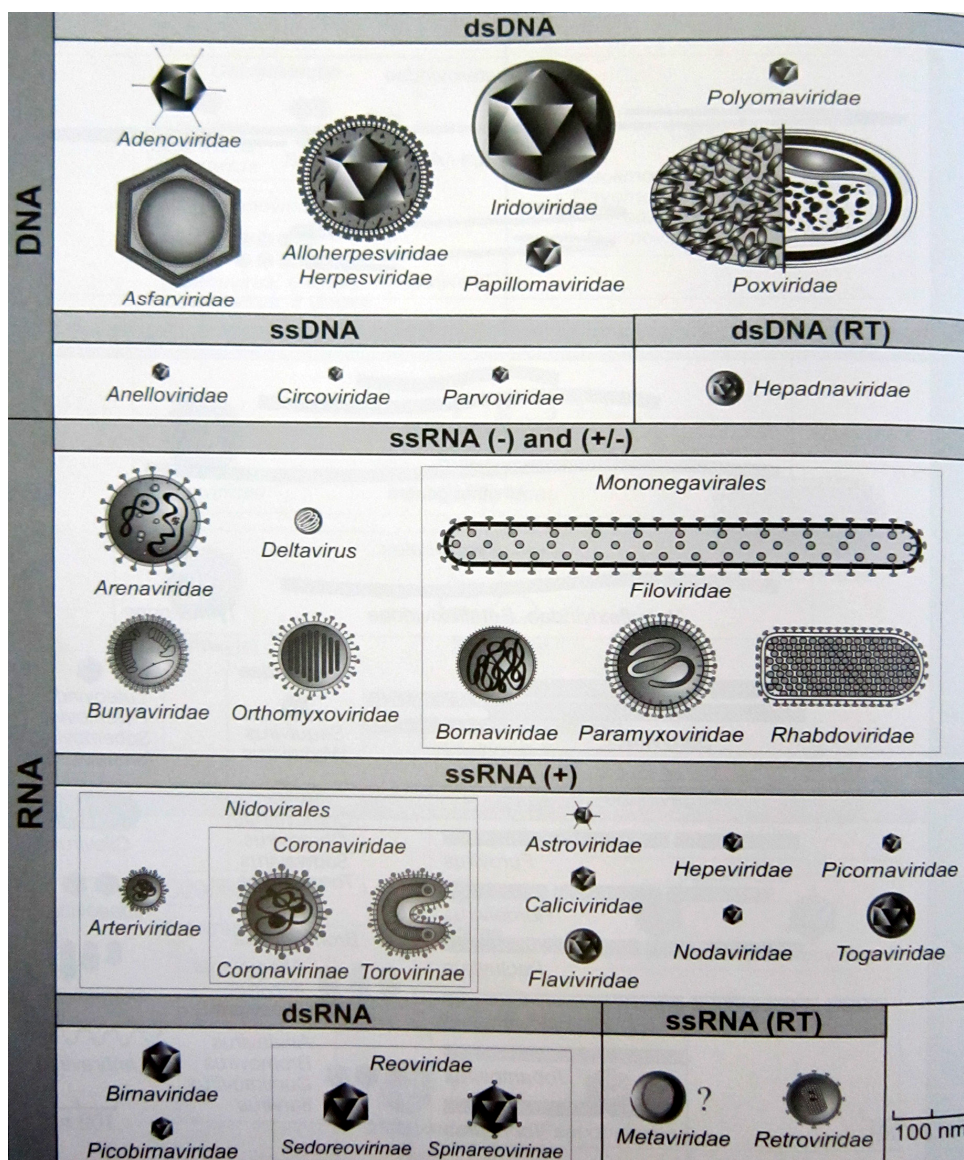


Рисунок 1. Классификация вирусов позвоночных. Адаптировано из «Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses», 9-th edition, 2011.

На рис. 2 представлена общая схема строения вируса табачной мозаики и кристалл ВТМ. Масса эритроцита ( $173 \text{ ТДа}$ , или  $173 \times 10^{12} \text{ Да}$ ), *E. coli* ( $180 \text{ ГДа}$ , или  $180 \times 10^9 \text{ Да}$ ), т.е. не самый крупный вирус герпеса по массе меньше *E. coli* примерно в 130 раз и превышает массу вируса ящура в 280 раз.

Первые наблюдения о самосборке *in vitro* белковых компонентов после диссоциации ВТМ привели Ф. Крика и Д. Уотсона (1956) к предположению о том, что вирусная оболочка состоит из симметрично расположенных, идентичных по строению белковых субъединиц [10]. Позже это положение было многократно подтверждено для вирусов с разным типом симметрии нуклеокапсида. Сферическая белковая оболочка вириона (shell), состоящая из идентичных, взаимодействующих между собой строго определенным образом субъединиц, может иметь один из трех видов симметрии: тетраэдрический, кубический или икосаэдрический, построенных соответственно из 12, 24 или 60 единиц. Последний способ укладки среди вирусов встречается наиболее часто [16].

Белки оболочки вириона (или суперкапсида) обеспечивают рецепторный тропизм вируса, т.е. возможность целевой доставки информации в определенный тип клеток, а белки сердцевин некоторых вирусов (обладающие мотивом ядерной транслокации) - способность адресной "доставки" транспортируемого материала в клеточное ядро. Белки репликативного комплекса (ферменты репликации вирусного генома) рекомбинантных вирусов, эффективно размножающихся в клетке, могут амплифицировать доставленную в клетку полезную информацию в миллионы раз и уничтожить больную клетку- мишень. Наноконструкции: химическая наночастица\биологически активная оболочка (природная, полученная путем мутагенеза генома или химической модификации) способны адресно концентрироваться в поврежденном участке организма, повышая локальную дозу лекарственного препарата, что обеспечивает селективность воздействия на тот или иной тип клеток.

Начало эры исследований по созданию нанобиотехнологий (в том числе – на основе вирусов) означало качественно новый скачок в философии получения лекарственных препаратов, методов диагностики, новых вакцин, средств адресной доставки лекарств к пораженному органу или ткани, выяснению индивидуальной чувствительности организма к лекарственным препаратам и возможным токсическим соединениям в окружающей среде, созданию новых средств и методов исследования биосистем и средств защиты организма. Это наиболее быстро развивающаяся в мире отрасль деятельности человека, вложения в которую по прогнозам зарубежных специалистов после 2012 г. превысят 1 трлн. долларов США в год. С 2007 г. по 2012 г. изменилось соотношение объемов в общей стоимости (100 %) нанотехнологической продукции: медицина и лекарственные препараты с 2 % выросли до 27 %, а электротехническая продукция возросла в 2 раза.

«Нано» (в переводе с латинского – «карлик»), единица длины, равная  $10^{-9} \text{ м}$ ) означает атомарно-молекулярный уровень получения новых знаний в области наук о жизни и создания технологий живых систем во имя улучшения качества и продолжительности жизни населения, а также укрепления репродуктивного, трудового и оборонного потенциала страны" [из Постановления XIX (82) Сессии Общего собрания РАМН от 21.12.2007 «Нанотехнологии и наноматериалы в медицине»].

Нанобиотехнология – область, применяющая методы и подходы нанотехнологии для создания устройств и методов с целью изучения биологических систем. В рамках нанобиотехнологии изучаются также возможности использования живых систем, в том числе искусственно модифицированных, для создания наноустройств и разработок для практической медицины [«Жизнь без опасности». – 2007. – № 3. – С. 64].

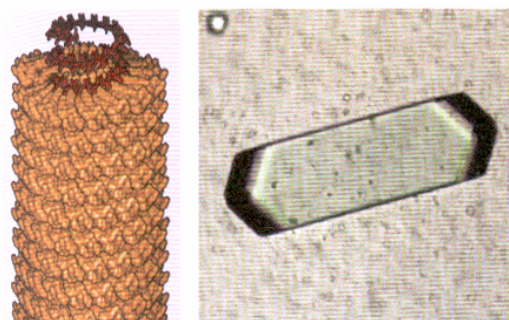
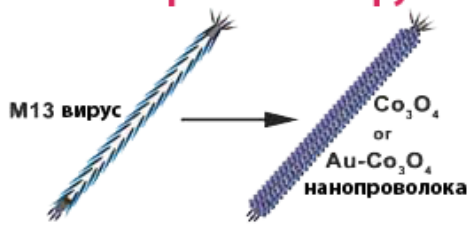


Рисунок 2.  
ВТМ и кристалл ВТМ, выращенный в космосе.

Наночастица – частица размером менее 100 нм (в некоторых случаях эта величина возрастает до 200–1000 нм): гомо- и гетероструктуры, состоящие из заранее рассчитанного числа атомов или молекул, взаимно ориентированных определенным способом. [Нанотехнологии / Ред.: Ю.Д. Третьякова. – М.: Физматлит, 2008. – 368 с.]. Нанобиочастица – частица или структура, сформированная природой или методами молекулярной биотехнологии из определенного, заранее заданного числа молекул с определенной характеристикой её составляющих: нуклеотидов, аминокислот, липидов, сахаров или их комбинации [академик РАН А.И. Арчаков].

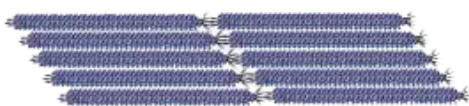
Единицы измерения: кластеры и наночастицы. Кластеры – это частицы из 30–500 атомов, наночастицы – 500–1 000 000 атомов. Стали широко использоваться единицы измерения длины: 1 нм (нанометр) =  $10^{-9}$  м; 1 Å (ангстрем) =  $10^{-10}$  м; массы: 1 фг (фемтограмм) =  $10^{-15}$  г; объёма: 1 зл (zeptolitр) =  $10^{-21}$  л; электростатической емкости: 1 аФ (аттофарада) =  $10^{-18}$  Ф; электростатической энергии заряда: 0.05 эВ. Исходя из того, что 1 Да равен  $1.66 \times 10^{-24}$  г и зная линейные размеры объекта, можно оценить массу и объём кластеров и наночастиц, содержащих разное число атомов.

### Шаблон работы с вирусом



### Инженерия сборки

Микроскопическая самосборка вируса



### Литиевая ионная батарея

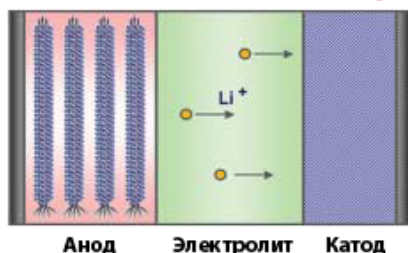


Рисунок 3. Фаг М13 для получения нанопленок и электродов для литиевых батарей.

Понятие «наномедицина» означает медицинское использование нанотехнологий, включающих создание наноматериалов на основе современных химических технологий и использовании природных нанобиоматериалов. В настоящее время для разработки адресной терапии интенсивно исследуются новые «наноинструменты»: дендримеры, липосомы, полимерсомы, мицеллы и вирусы [21, 23, 24, 36]. Для клинического применения уже используется (или находятся на стадии клинических испытаний) более 30 разных препаратов, например пегилированный (PEG-) липосомальный доксорубин (Doxil/Caelix), PEG-альфа-интерферон, конъюгированный с альбумином паклитаксел (Abraxan), связанные с наночастицами контрастирующие вещества для исследований с помощью методов магнитного резонанса, полилактатгликолевый комплекс для доставки лекарственных препаратов, наконец, вакцины на основе вирусов, уже созданные [13, 20, 28, 37] или потенциальные кандидаты [11].

С позиций фармакокинетики, токсичности, иммуногенности и специфичности к определенным типам тканей и клеток каждый из системных подходов имеет свои достоинства и ограничения. Даже после получения *in vitro* обнадеживающих результатов требуется дополнительное время для подтверждения безвредности препарата в отношении токсикологии, биодоступности и биodeградации в организме. Наиболее оптимальными являются бионаноматериалы, которые более безопасны и перспективны.

Вирусы как объекты и инструменты нанобиотехнологии занимают особое место в современной наноиндустрии и инновационных разработках по следующим основным причинам.

*Первая.* Большую часть вирусов с любым типом строения (с разным симметрии нуклеокапсида и строения вириона) можно считать нанобиочастицами, которые построены из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и нескольких видов многократно повторяющихся белковых молекул, формирующих правильно упорядоченные структуры и даже кристаллы.

У некоторых вирусов нуклеокапсид (сердцевина) покрыт липидной оболочкой с встроенными в нее вирусными гликопротеинами, индуцирующими в зараженном организме вируснейтрализующие антитела. Размеры большинства вирусов человека, животных и растений обычно не превышают 100 нм и такие вирусы могут быть использованы для получения наноконтейнеров, магнитных наночастиц, нанoeлектродов (рис. 3), нанопроводников и нанокристаллов с заранее заданными свойствами [11, 15, 22, 26, 32, 33]. Присущие вирусам механизмы самосборки вирионов стали новым принципиальным подходом для конструирования вирусоподобных частиц с полезными свойствами [15, 26].

*Вторая.* Манипуляции с отдельными вирусными генами или регуляторными фрагментами вирусного генома с целью конструирования новых, не существующих в природе вирусов, можно отнести к нанобиотехнологиям. К таким технологиям медицинского назначения можно отнести исследования по созданию «химерных» вирусов на основе генетического материала вирусов бактерий и млекопитающих, вирусов растений и млекопитающих (человека), обладающих полезными свойствами (вакцинные препараты, компоненты диагностических тест-систем, лекарственные препараты адресной доставки). Сюда же нужно отнести и методы обратной генетики, основанные на манипуляциях с направленной реассортацией отдельных вирусных генов (например, получение вакцинных вариантов вируса гриппа), а также «подсмотренные» у вирусов методы химического синтеза микронаноконтейнеров, основанных на взаимодействии биологических макромолекул. Метод химической мимикрии способа самосборки вирусных капсидов сегодня эффективно используется для создания микро наноконтейнеров объемом около  $1\ 500\ \text{Å}^3$  [27].

*Третья.* Нанотехнологические исследования в области вирусологии, основанные на сочетании новых наноматериалов и биотехнологических конструкций с использованием вирусных частиц или их компонентов, могут привести к созданию сверхминиатюрных и эффективных диагностических тест-систем, принципиально новых лекарственных препаратов, а также новых методов научного познания [32, 33]. К таким исследованиям можно отнести разработку новых методов индикации вирусов на основе генных чипов, мультиплексного анализа генного и антигенного вирусного полиморфизма, а также методы анализа полиморфизма клеточных генов млекопитающих и человека для изучения молекулярных механизмов патогенеза вирусных инфекций.

Таким образом, использование уникальных свойств вирусов как нуклеопротеидных частиц, формирующихся путем самосборки биополимеров (нуклеиновой кислоты и белка), привело к созданию новой технологической платформы для решения задач в области медицины, фармацевтического производства, новых приемов исследования биологических систем, электроники и других направлений [1, 21, 38]. В основе новых технологий лежит возможность направленной химической или генетической модификации вирусной частицы, в результате чего она приобретает новые свойства. Так, например, инкапсулирование в вирусную частицу неорганических веществ (репортерных материалов или металлов) открывает новые возможности для создания неинвазивных методов ранней диагностики и лечения инфекционных и соматических заболеваний [31, 38].

Вирусы, тропные к определенным тканям человека, представляют собой идеальную, созданную природой основу в качестве векторов для избирательной доставки реагентов в клетки-мишени. С этой целью интенсивно исследуются представители вирусов разных семейств – вирусные наночастицы (ВНЧ) и лишённые генома вирусоподобные частицы (ВПЧ). С помощью генетических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов ВНЧ и ВПЧ модифицируют и применяют в медицине в качестве носителей полезной информации (лекарственные препараты, создание новых вакцин). Для этого отбирают вирусы, которые репродуцируются в высоких титрах (до  $10^6$  частиц на клетку) в их естественных хозяевах, а для накопления ВПЧ наиболее удобны гетерологичные системы экспрессии. Среди современных векторов вирусной природы наиболее предпочтительны вирусы бактерий, растений и насекомых: 1) бактериофаги с икосаэдрическим типом строения капсида – P22, T7, MS2, Q-beta; 2) бактериофаги со спиральным типом симметрии –

M13 (в клетках *E. coli*) [9]; 3) вирусы растений с икосаэдрическим типом капсида – Brome mosaic virus (BMV), Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV), Cowpea mosaic virus (CPMV), Hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV), Red clover necrotic mottle virus (RCNMV), turnip yellow mosaic virus (TYMV); 4) вирусы растений со спиральным типом симметрии нуклеокапсида – Potato virus X (PVX), Tobacco mosaic virus (TMV) [8, 12]; 5) бакуловирус Flock House virus (FHV), размножающийся в клетках насекомых [29].

Считается, что вирусы растений, не имеющие рецепторов связывания с клетками человека, наименее для него опасны. Все названные вирусы накапливаются в клетках основного хозяина в больших количествах (4-5 г/кг веса растений) и могут быть использованы для получения ВНЧ и ВПЧ [1, 21, 29]. Вирусоподобные частицы (ВПЧ) получают из вирусных наночастиц путем рН-индуцированного лизиса вирионов и последующего щелочного гидролиза освобождающейся из вирионов нуклеиновой кислоты или путем выделения индивидуальных белков вириона и последующей сборки уже модифицированных белков в вирусоподобные частицы [25].

В качестве векторов на основе вирусов позвоночных используют генномодифицированные ослабленные варианты вируса, не способные вызывать патологию у человека, но сохраняющие свои иммуногенные свойства или адресного белка. Так, например, в настоящее время на основе простых и гибридных вирусных векторов (включая лентивирусы, вирусы семейства *Herpesviridae* (HSV, EBV), ретровирусы, альфавирусы (SV, SFV), рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (AAV), обезьяний вирус SV40, HSV\AAV, HSV\EBV, HSV\EBV\ретровирус, Ad\AAV, Ad\ретровирус) разрабатываются модели для доставки генов в ЦНС с целью регенерации поврежденных клеток. Число публикаций об использовании вирусных векторных систем сегодня превышает несколько десятков тысяч. Ожидается, что генно-инженерная модификация вирусного генома, приводящая к экспрессии на поверхности вириона нескольких целевых антигенов, в скором времени приведет к созданию эффективных полиэпитопных вакцин. Перспективным направлением нанобиотехнологий является использование вирусов в качестве «биореакторов», когда в вирусную частицу внедряют заранее заданное число молекул какого-либо фермента. Такие частицы могут быть использованы для изучения процессов биокатализа и адресной доставки «дефицитного» фермента в органы и ткани, что станет ещё одним средством терапии.

Приоритеты фундаментальных исследований и разработок в медицинской нанобиотехнологии были сформулированы в комплексной программе РАМН на период 2008–2015 гг. «Нанотехнологии и наноматериалы в медицине». В рамках этой программы были рекомендованы основные направления научных исследований и разработок, которые запланировано развивать до 2015 г. по разделу «Инфекционная (вирусная) патология»:

а) «Биологические наночипы для диагностики соматических и инфекционных заболеваний, в том числе для видовой идентификации возбудителей особо опасных инфекций и токсинов».

б) «Наночастицы как лекарственные препараты нового поколения и как контейнеры для адресной доставки лекарств в клетки-мишени».

в) «Саморазмножающиеся геномы, применяемые в области биотехнологии и медицины с целью производства лекарств, фармакологического скрининга и моделирования патологических процессов».

г) «Новые высокочувствительные методы экспресс-анализа патологических состояний человека».

Эти направления не исчерпывают всех современных возможностей применения нанотехнологий в области вирусологии. Одним из показателей приобщённости к нанотехнологиям и исследованиям в этой области является использование знаний на стыке наук: физики, химии, молекулярной биологии, бионики, геномики, протеомики и других наук. Применительно к вирусам как наноагентам биологической природы предсказать все перспективные направления развития ещё более затруднительно.

Наше сообщение мы рассматриваем как промежуточный отчет в рамках Программы РАМН «Нанотехнологии и наноматериалы в медицине (2008–2015)». На протяжении 2008–2012 гг. в ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» были выполнены следующие исследования.

H1	H1	H1	H1	H2	H2	H2	
H3	H3	H3	H3	H3	H3	H4	
H5	H5	H5	H5	H5	H5	H6	
H7	H7	H7	H7	H7	H8		
H9	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
N1	N1	N1	N1	N1			
N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	

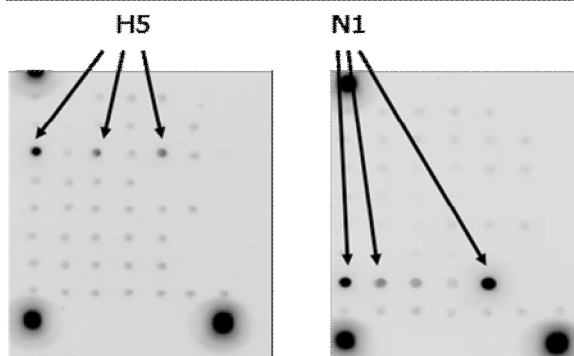


Рисунок 4. Новый диагностикум, основанный на технологии генных микрочипов. Набор позволяет выявить вирус гриппа А 15 подтипов Н и двух подтипов N у любых видов животных и человека.

**1. Биочипы.** Олигонуклеотидные биочипы – упорядоченные библиотеки олигонуклеотидных зондов, нанесенные с помощью роботов на поверхность твердой подложки таким образом, что каждый элемент биочипа содержит индивидуальный олигонуклеотид с известной первичной структурой (20–75 bp). Прореагировавший («сгибризовавшийся») с олигонуклеотидом участок исследуемого генетического материала имеет определенное смысловое значение, которое учитывается детектирующим прибором. Для усиления сигнала используется предварительная амплификация фрагментов исследуемых РНК или ДНК. Белковые чипы основаны на миниатюризации иммунохимических реакций антиген-антитело и систем детектирования продуктов реакции. Это позволяет уменьшить объем исследуемого материала, сокращает время анализа, позволяет масштабировать исследования [6].

В настоящее время производят биочипы, содержащие одновременно сотни и тысячи олигонуклеотидных зондов, ковалентно иммобилизованных на поверхности нейлоновой мембраны или стекла. Подход, разработанный в ИМБ РАН под руководством академика РАН А.Д. Мирзабекова [20], основан на *оригинальной идее* иммобилизации зондов в *трёхмерном объёме гидрофильного геля*. Такая фиксация заранее "калиброванных" (гомогенных по величине и последовательности нуклеотидов) зондов повышает точность, чувствительность, специфичность и надежность определения, снижает стоимость анализа и в ряде случаев позволяет интерпретировать результаты гибридизации даже без привлечения программных средств.

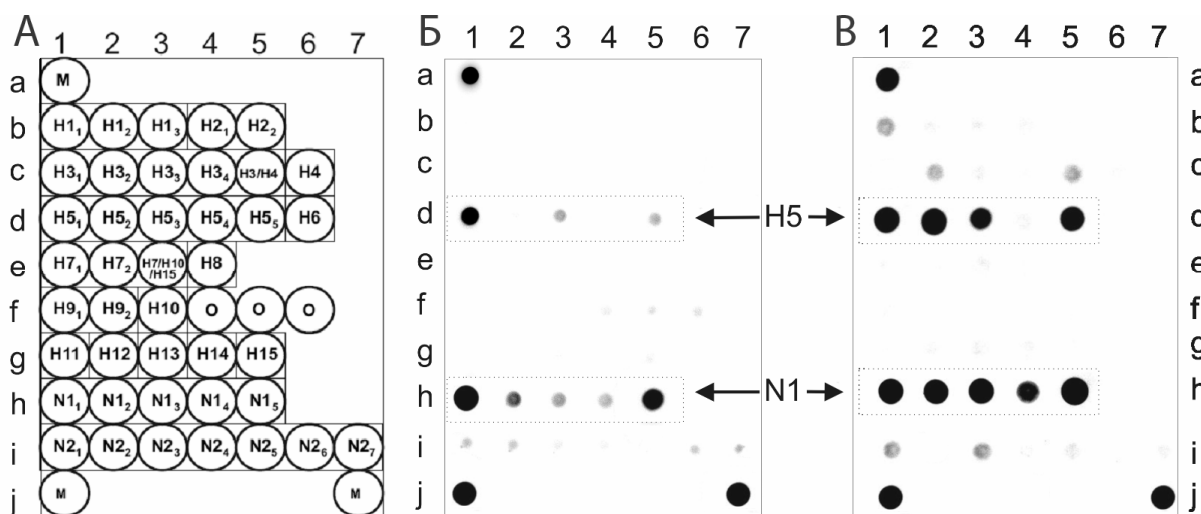


Рисунок 5. Результаты типирования штаммов HPAI / H5N1 с помощью биологических микрочипов. А: Структура микрочипа; Б: Результат анализа вируса A/chicken/Novosibirsk/64/05 (H5J 2.2); В: Результат анализа вируса A/chicken/Primorje/1/08 (H5J 2.3.2).



ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» совместно с сотрудниками Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН разработан метод экспресс-индикации эпидемически значимых подтипов вируса гриппа А методом гибридизации на олигонуклеотидных чипах с трехмерными гелевыми элементами. Метод позволяет дифференцировать 15 гемагглютининов (HA1-HA15) и 2 варианта нейраминидазы (NA1-NA2) вируса гриппа А (рис. 4).

Показана принципиальная возможность дифференцирования различных генотипов высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) (рис. 5), эпидемических и пандемических вариантов гриппа H1N1 по картине гибридизации. Один анализ на чипах соответствует 17 реакциям ПЦР. Проведены клинические испытания метода, готовится заявка для патентования метода. В настоящее время выполняются исследования по созданию биочипа, обеспечивающего обнаружение лекарственно-резистентных форм вируса гриппа. Разработанный вариант чипа был использован во время пандемии гриппа А (H1N1) pdm09.

**2. Латексные диагностикумы на основе полиакролеиновых сфер.** С целью создания альтернативного методу ИФА способа выявления маркёров гепатита С были проведены исследования по разработке нового метода быстрого определения антител к вирусу гепатита С (ВГС) на основе агглютинации латексных частиц, сенсibilизированных очищенными рекомбинантными белками ВГС. При конструировании экспериментальных диагностикумов для экспресс-определения антител к ВГС были выяснены оптимальные параметры компонентов тест-систем, условий получения сенсibilизированных антигеном микрочастиц и условий проведения реакции. Экспериментальным путем было установлено, что для использованных нами типов латексных суспензий (с альдегидным спейсером на поверхности частицы) и рекомбинантных вирусных антигенов ВГС (области антигенных детерминант белков С (118 а.о.), ns3 (267 а.о.), ns4 (86 а.о.) и ns5 (139 а.о.)) оптимальная концентрация вирусного антигена при сенсibilизации латексов составляет 20 мкг/мл. Подобраны наиболее экономные условия проведения реакции латекс-агглютинации (объём испытуемой сыворотки – 5–10 мкл, общий объём реакции – 50 мкл, время проведения реакции – 2 ч). В этих условиях уровни выявляемых антител достигают максимальных показателей, а расход вирусного антигена является минимальным, что обеспечивает экономичность такого тестирования (рис. 6).

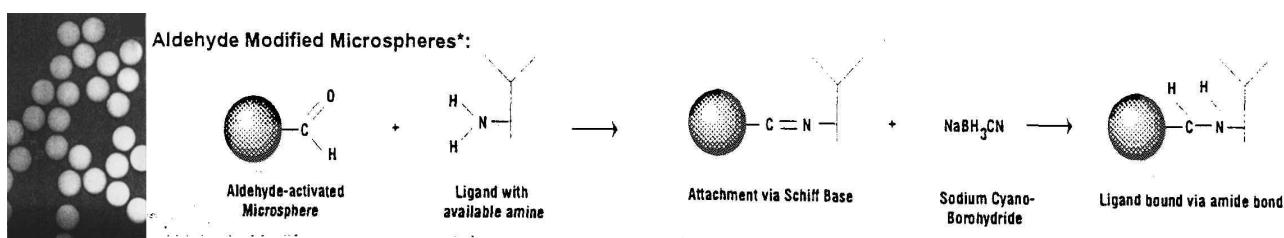


Рисунок 6. Латексные частицы с альдегидными группами на поверхности: электронная микроскопия и схема получения диагностикума.

Использование полученных рекомендуемым способом латексных диагностикумов позволяет количественно определить не только наличие специфических антител в испытуемой сыворотке, но и выявлять уровни специфических антител к индивидуальным вирусным белкам: белку С нуклеокапсида и неструктурным белкам вириона ns3 и ns4.

Разработана композиция и оптимальные условия сенсibilизации полимерных наночастиц вирусными антигенами (натуральными и/или генно-инженерными) для бесприборного анализа на основе суспензий твердого полимерного носителя) - для экспресс-выявления маркёров лихорадки Синдбис, Западного энцефаломиелита лошадей и гепатита С. В последнем случае проведены испытания метода на клиническом материале от больных гепатитом С. Работа выполняется совместно с ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН (руководитель – академик РАМН В.В. Зверев).

3. **Атомно-силовая микроскопия** позволяет оценить трехмерное изображение клетки, получить такой важный элемент в исследовании как количественные характеристики клеток: размер клетки, ядра, высоты различных участков поверхности клетки.

Принцип работы атомно-силового микроскопа прост: микроскоп сканирует поверхность образца на расстоянии нескольких ангстремов (контактная АСМ) при помощи микроиглы, расположенной на упругой микропластинке – кантилере. Между острием микроиглы и поверхностью образца возникают сила взаимодействия – сила отталкивания, меняющиеся в соответствии с рельефом поверхности, что вызывает деформацию кантилевера.

Деформация кантилевера определяется оптическим методом. Лазерный луч, направленный на зеркальную поверхность с тыльной стороны кантилевера, отражается от нее и регистрируется фотодетектором. Детектор измеряет степень отклонения кантилевера по смещению отраженного от его поверхности лазерного луча. Перемещение образца производится прецизионными пьезодвигателями, которые управляются персональным компьютером. После завершения сканирования изображение в двухмерном (трехмерном) виде выводится на экран компьютера. АСМ-исследование дает возможность получить дополнительные характеристики объектов, – параметры исследуемой поверхности (жесткость, электропроводность, и т.п.).

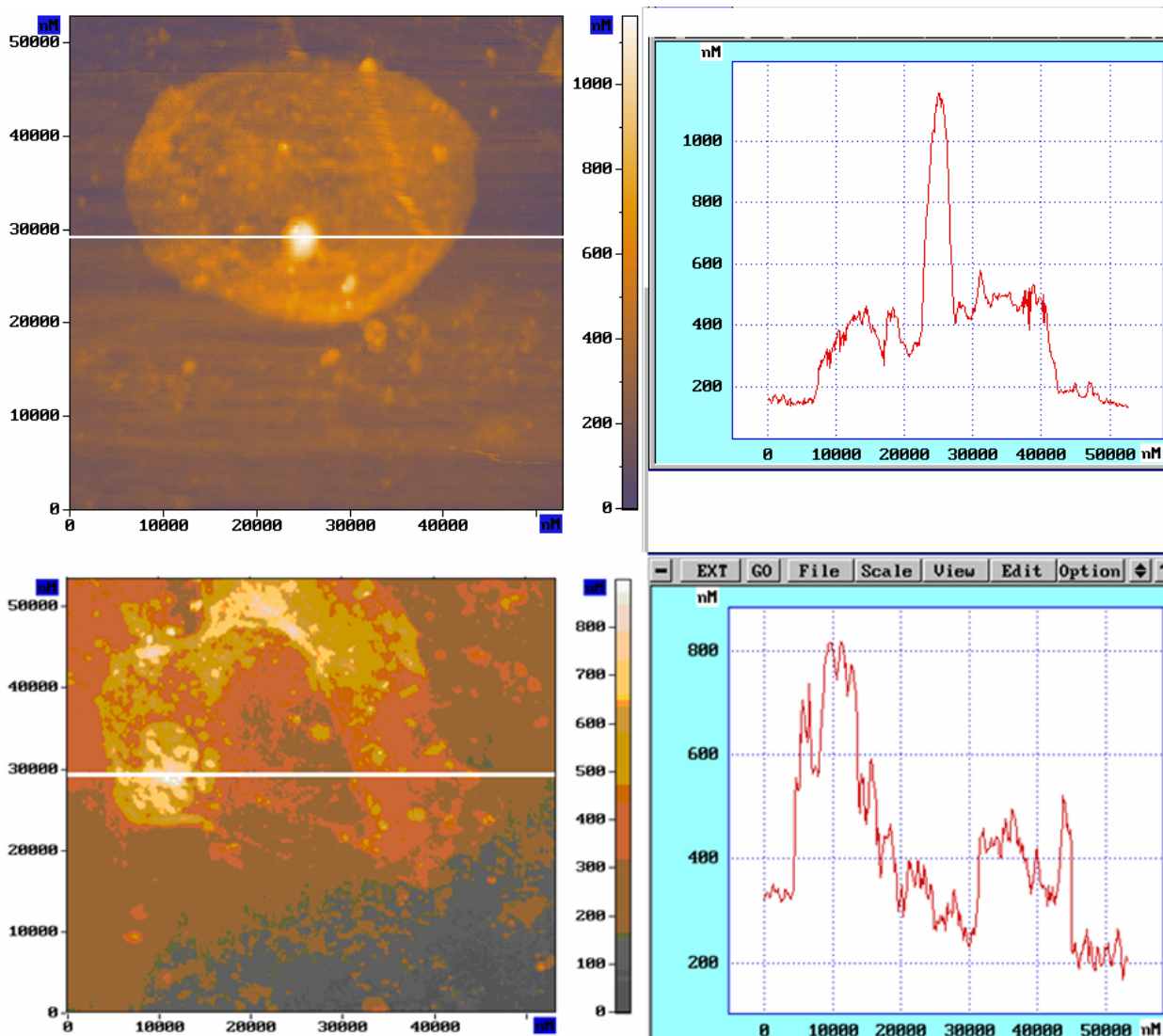


Рисунок 7. Атомно-силовая микроскопия для диагностики папилломатозов. Фотография и профиль поверхности нормальной (сверху) и патологической (внизу) клеток.

С использованием этого метода (АСМ) разработан способ оценки поверхности нормальных и вирус-инфицированных клеток (рис. 7). Показано, что изменения поверхности вирус-инфицированных клеток (вирусы папилломы, ВИЧ-1, альфавирусы) различны в зависимости от типа возбудителя, что позволяет дифференцировать инфицированные и нормальные клетки. Совместно с сотрудниками Онкологического Института им. П.А.Герцена на клиническом материале установлена возможность выявления специфических коилоцитов в препаратах папилломатозов, что имеет важное значение для диагностики этого заболевания. Рассматривается перспектива диагностики вирусных инфекций на основе иммунохимических реакций с использованием АСМ.

**4. Химерные вирусы растений.** Вирионы вируса табачной мозаики (ВТМ) (*Virgaviridae, Tobamovirus*) относятся к вирусам со спиральным типом симметрии (шаг спирали 2.3 нм), имеют вид полого цилиндра диаметром 18 нм и длиной 300–310 нм. Геном ВТМ представлен одной молекулой одноцепочечной РНК положительной полярности и состоит из 6 395 bp. Белковый чехол генома ВТМ сформирован единственным структурным белком (coat protein, 17–18 кДа) – 2 130 одинаковых субъединиц (имеющих сайты связывания с вирионной РНК), а транспорт вируса от клетки к клетке (cell-to cell movement) осуществляется с помощью неструктурного белка (ns protein, 28-31 кДа). Репродуцируясь, вирус накапливается в растениях в огромных количествах (до 5-10 г/кг листьев), что позволяет использовать ВТМ в качестве эффективного вектора – носителя чужеродных антигенных детерминант, экспонированных на поверхности вирусных частиц [1].

Вирус гриппа содержит 8 геномных РНК. Фрагменты гена НА были встроены в вектор на основе ВТМ, введены в клетку и получены химерные продуценты. Преимуществом таких систем на основе вирусов растений является простота работы и высокий выход продукта - до 3-5 г/г свежих листьев [8]. Работа выполняется совместно с Институтом физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского РАН (Ю.Л. Дорохов и сотр.).

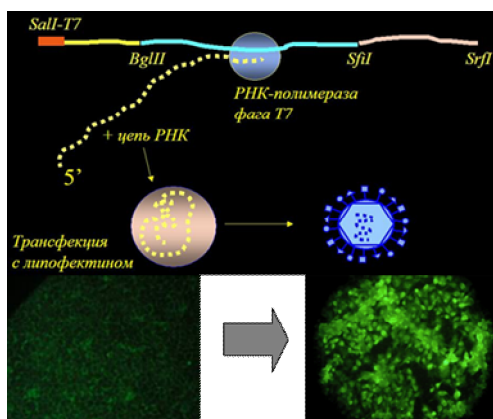


Рисунок 8. Системы обратной генетики для создания вирусов с полезными свойствами. Схема системы (сверху) и результат детекции полученного вируса в культуре клеток (люминесцентная микроскопия) (внизу).

**5. Обратная генетика** позволяет получить целенаправленные изменения в геноме РНК-содержащих вирусов путем последовательного переписывания геномной РНК в кДНК, введения нужных мутаций в кДНК, переписывания кДНК в РНК и получение нового вируса с заданными характеристиками [7] (рис. 8).

Созданы системы обратной генетики для двух моделей вирусов с одноцепочечной РНК позитивной полярности: пести- и артеривирусов. Получена возможность конструировать новые вирусы с изменёнными свойствами структурных и неструктурных белков, а также регуляторных элементов, включая вирусы-рекомбинанты из гомо- и гетерологичных вирусов с полезными свойствами. С помощью этой технологии создан химерный пестивирус с заменёнными гликопротеинами оболочки

вирионов и новыми свойствами вакцинного штамма.

**6. Новые наносорбенты.** В качестве сорбентов были использованы углеродные материалы (углеродные нанотрубки, детонационные алмазы и шихта) и полимеры - полианилин (ПА) в виде основания, солей, интерполимерных комплексов полианилина с полимерными кислотами, полианилиновые нанотрубки (рис. 9). Интерполимерные комплексы полианилина в зависимости от ионной силы раствора могут находиться в виде глобул либо стержней длиной от 500 до 1500 нм. Кроме того, исследованы покрытые полианилиновой пленкой углеродные нанотрубки, наноалмазы и шихта [3, 4, 17, 18].

Установлены высокие адсорбционные свойства этих оригинальных углеродных и полимерных нанобразований, обеспечивающих возможность их эффективного использования для создания систем обеззараживания воды от вредных примесей, токсических соединений и вирусов. Такие материалы и комплексы сорбировали вирусы гриппа А и В, а также белки невирусной природы (рис. 10).

Впервые показано, что пленки полианилина могут быть использованы для детектирования вирусов современным методом плазмонного резонанса, а также для приготовления подложки для белковых чипов. Установлено, что покрытие углеродных материалов полианилиновой пленкой увеличивает их сорбционную активность.

Работа выполняется совместно с д.х.н. В.Ф. Ивановым, д.х.н. Б.В. Спициным (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН) и к.х.н. И.Ю. Сапуриной (Институт высокомолекулярных соединений РАН).

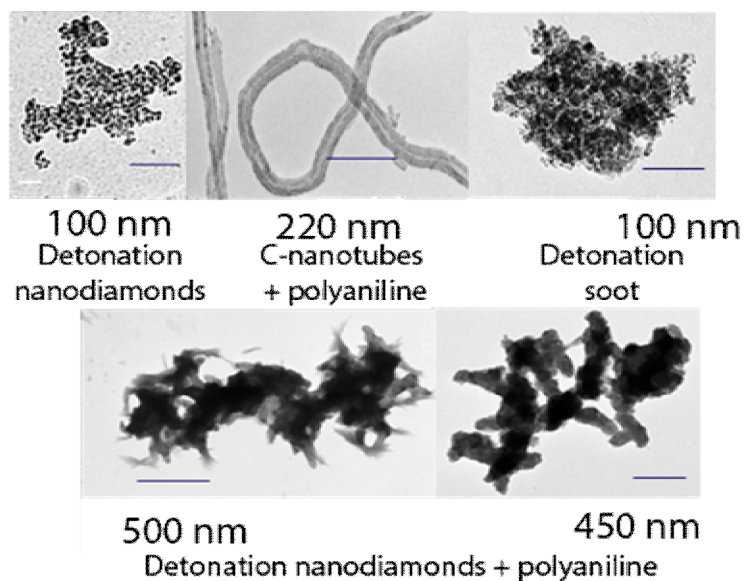


Рисунок 9. Наносорбенты на основе полианилина и наноалмазов.

### Полимерный сорбент (Атомно - силовая микроскопия)

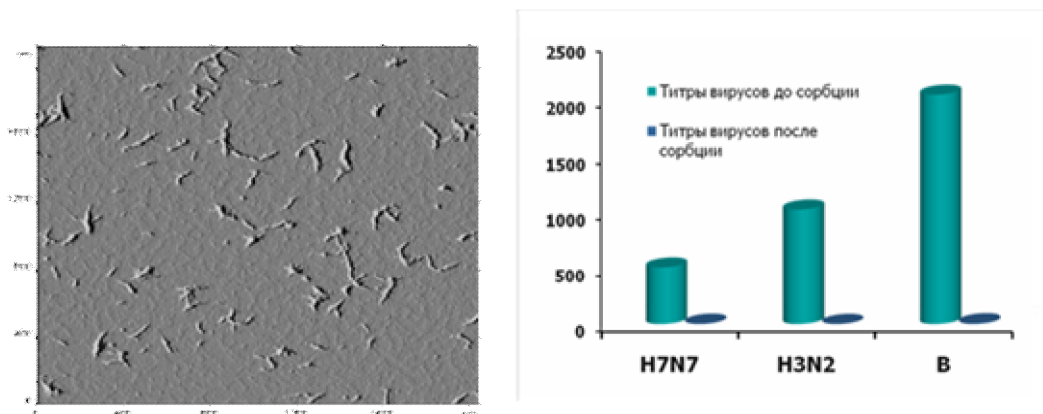


Рисунок 10. Сорбция пандемических вирусов гриппа А (H1N1) pdm09 наноразмерными алмазами и их комплексами с полианилином.

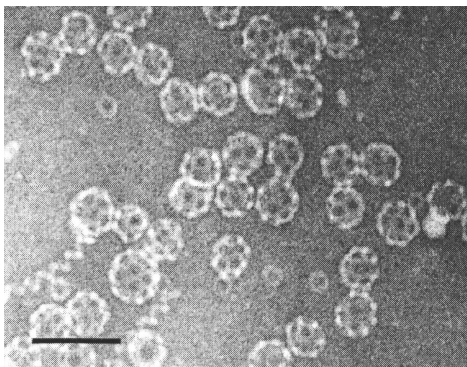


Рисунок 11. Фотография частиц ISCOM – иммуностимулирующего комплекса, состоящего из антигена, холестерина, фосфолипидов и природных сапонинов.

**7. Антиретровирусный и противогерпетический эффект фуллевира** – производного фуллерепа  $C_{60}$  и полигидроаминоасляной кислоты – достоверно установлен в клинических исследованиях и при экспериментальном герпетическом энцефалите. Рассматривается перспектива использования Ф как одного из компонентов микробицидных мазей при ВИЧ-инфекции.

**8. ISCOM** – иммуностимулирующий комплекс, состоящий из антигена, холестерина, фосфолипидов и природных сапонинов. Показана его более высокая эффективность (в 10 раз) по сравнению с вакцинами на основе обычных адьювантов (рис. 11).

Выполненные в ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ комплексные исследования с использованием подходов на стыке наук показали высокую перспективность теоретических разработок и необходимость их масштабирования для практических целей. В повестке дня – обновление и укрепление технологической базы, её непрерывное совершенствование. В основе каждого из указанных действий лежит полноценное финансирование и закрепление талантливой молодежи в научно-исследовательских институтах страны.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Атабеков И.Г.* Применение вирусных структур в качестве инструментов нанотехнологий // Российские нанотехнологии. – 2007. – Т. 3. – Вып. 1–2.
2. *Жданов В.М.* Эволюция вирусов. – М.: Медицина, 1990. – 376 с.
3. *Иванова В.Т., Иванов В.Ф., Грибкова О.Л.* и др. Полианилин в качестве сорбентов для удаления вирусов, белков невирусной природы и в качестве основы для иммуносорбентов. Патент № RU 2372951 С2. – 2009.
4. *Иванова В.Т., Иванова М.В., Бурцева Е.И.* и др. Взаимодействие вирусов гриппа А и В с сорбентами на основе наноалмазов // Вопросы вирусологии. – 2012. – № 2. – С. 9–13.
5. *Ивановский Д.И.* О двух болезнях табака. Табачная пепелица, Мозаичная болезнь. – Санкт-Петербург: Типография В. Тимакова (Невский просп., д. 7), 1892.
6. *Гребенникова Т.В.* Биочипы // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 339–343.
7. *Забережный А.Д.* Метод обратной генетики // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 343–347.
8. *Комарова Т.В., Скулачев М.В., Зверева А.С.*, и др. Новый вирусный вектор для эффективной продукции таргетных белков в растениях // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – С. 846–850.
9. *Bar H., Yacobi I., Benhar I.* Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines // BMC Biotechnology. – 2008. – V. 8. – P. 37–51.
10. *Crick F.H.C., Watson D.* Structure of small viruses // Nature. – 1956. – V. 177. – P. 473–475.
11. *Farrel D., Alper J., Ptak K.*, et al. Recent advances from National Cancer Institute alliance for nanotechnology in cancer // ACS Nano. – 2010. – V. 4. – N 2. – P. 589–594.
12. *Frolova O.Y., Petrunia I.V., Komarova T.V.*, et al. Trastuzumab-binding peptide display by Tobacco mosaic virus // Virology. – 2010. – V. 407. – N 1. – P. 7–13.
13. *Garnier A., Cote J., Nadeau I.*, et al. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells // Cytotechnology. – 1994. – V. 15. – P. 145–155.
14. *Geiss B.D., Shimokevitz L.H., Sackal C.I., Olson K.E.* Recombination-ready Sindbis replicon expression vectors for transgene expression // J. Virology. – 2007. – V. 4. – P. 112.
15. *Guo P.A., Lee T.J.* Viral nanomotors for packaging of dsDNA and dsRNA // Molecular Microbiology. – 2007. – V. 64. – N 4. – P. 886–903.

16. *Harrison S.C.* Principles of virus structure, 2007 // In: *Fields Virology* / Eds.: D.V. Knipe, P.H. Howley, D.E. Griffin et al. – Baltimore–NY–London: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – 5-th edition. – P. 60-98.
17. *Ivanov V.F., Ivanova V.T., Kurochkina Y.E., et al.* Virus sorbents on polyaniline interpolymer complexes, composites and their sorption properties // In: *Materials of AIP Conference Proceedings*. – 2010. – P. 46–48.
18. *Ivanova V.T., Ivanova M.V., Spitsyn B.V., et al.* Interaction of nanodiamonds materials with influenza viruses // In: *Materials of IV Nanotechnology International Forum (Rusnanotech 2011)*. – J. Physics. Conference Series. – 2012. – P. 345.
19. *Ivanovska I.L., de Pablo P.J., Ibarra B.* Bacteriophages capsids: tough nanoshells with complex elastic properties // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – V. 101. – N 20. – P. 7600–7605.
20. *Liu W.T., Mirzabekov A.D., Stahl D.A.* Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach // *Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 3. – N 10. – P. 619–629.
21. *Lu J.M., Wang X.W., Marin-Muller C.* Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2009. – N. 9. – P. 325–341
22. *Ma J., Nolte R., Cornellissen J.* Virus-based nanocarriers for drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – V. 64. – P. 811–825.
23. *Mao C., Solis D.J. Jr., Reiss B.D.* Virus-Based Tool kit for the Directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires // *Science*. – 2004. – V. 303. – N 5655. – P. 213–217.
24. *Majoros I.J., Williams C.R., Baker J.R. Jr.* Current dendrimer applications in cancer diagnosis and therapy // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2008. – V. 8. – P. 1165–1179.
25. *Manchester M., Singh P.* Virus-based nanoparticles (VNP): platform technologies for diagnostic imaging // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2006. – V. 58. – N 14. – P. 1505–1522.
26. *Mueller A., Kadri A., Jeske H., Wege C.* In vitro assembly of Tobacco mosaic virus (BMV) coat protein variants derived from fission expression clones or plants // *J. Virol. Methods*. – 2010. – V. 166. –P. 77–85.
27. *Nam K.T., Kim D.-W., Yoo P.J. et al.,* Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes // *Science*. – 2006. – V. 312. – P. 885–888.
28. *Olson F.J., Hu Y.H.E., Keinan E.* Chemical mimicry of viral capsid self-assembly // *Proc. Natl. Acad. USA*. – 2007. – V. 104. – P. 20731–20736.
29. *Peek L.J., Middaugh C.R., Bercland C.* Nanotechnology in vaccine delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – V. 60. – P. 9915–9928.
30. *Schneeman A., Young M.J.* Viral assembly using heterologous expression systems and cell extracts // *Adv. Protein Chem.* – 2003. – V. 64. – P. 1–36.
31. *Seop K.I., Choi Y.W., Kang Y., et al.* Improvement of Virus Safety of an Antihemophilic Factor IX by Virus Filtration Process // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – V. 18. – N 7. – P. 1317–1325.
32. *Souza G.R., Cristianson D.R., Slaguicini F.I.* Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents // *Proc. Natl. Acad. USA*. – 2006. – V. 103. – P. 37–51.
33. *Steinmetz N.* Viral nanoparticles as platforms for next generation therapeutics and imaging devices // *Nanomedicine*. – 2010. – V. 6. – N 5. – P. 634–641.
34. *Vildis I., Shukla S., Steinmetz N.* Applications of viral nanoparticles in medicine // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2011. – V. 22. – P. 901–908.
35. *Villareal L.P.* Viruses and the evolution of life. – Washington: ASM Press, 2005. – dc20036–2904.
36. *Virus Taxonomy* // In: *Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses* / Eds: A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz. – Elsevier Science, 2011.
37. *Xing Y., Rao J.* Quantum dot bioconjugates for in vitro diagnostics and in vitro imaging // *Cancer Biomark.* – 2008. – N 4. – P. 307–319.
38. *Wagner V., Dullaart A., Bock A.K., et al.* The emerging nanomedicine landscape // *Nat. Technology*. – 2006. – V. 24. – N 10. – P. 1211–1217.
39. *Willis B., Eubanks L.M., Wood M.R., et al.* Biologically templated organic polymers with nanoscale order // *Proc. Natl. Acad. USA*. – 2008. – V. 105. – N 5. – P. 1416–1419.