© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013
УДК 615.371:578.832].012

Н.В. Петухова[1], П.А. Иванов[1], А.И. Мигунов[2]

Вирусоподобные частицы – новая стратегия для создания противогриппозных вакцин

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра вирусологии; [2]ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

Многочисленные исследования показали, что с помощью процесса самосборки одновременная экспрессия некоторых белков вируса гриппа в клетке может приводить к образованию вирусоподобных частиц (ВПЧ) даже в отсутствие вирусного генома. Морфологическое и антигенное сходство гриппозных ВПЧ с нативными вирионами представляет собой перспективную основу для новых противовирусных вакцин. В последнее десятилетие угроза появления штаммов вируса гриппа с пандемической потенцией становится все более актуальной. В связи с этим была разработана технология получения нового поколения безопасных и эффективных неэмбриональных вакцин, полученных на основе гриппозных ВПЧ в различных экспрессионных системах, имеющих значительные преимущества по сравнению с существующими способами производства вакцин. Подобные вакцины индуцируют в организме животных и людей полноценный гуморальный и клеточный иммунный ответ. В настоящем обзоре представлен анализ литературы по теме гриппозных ВПЧ, полученных в различных экспрессионных системах: клетках насекомых, млекопитающих и растений.

Ключевые слова: *грипп, вирусоподобные частицы, вакцина, экспрессионная система*

Virus-Like Particles – A New Strategy for Production of Vaccines against Influenza Virus

N. V. Petukhova[1], P. A. Ivanov[1], A. I. Migunov[2]

[1] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Virology, Moscow, Russia; [2] Federal State Scientific-Research Institution of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Numerous studies demonstrated that simultaneous expression of some viral proteins in the cell with the aid of a process of self-assembly might lead to the formation of the virus-like particles (VLP) even in the absence of the viral genome. The morphological and antigenic similarity between VLP and native virions represents a promising approach to the new type of vaccines. In the last decade, the threat of the influenza strains with pandemic potential becomes more important. Therefore, the technology for obtaining a new generation of safe and effective non-embry o culture vaccines was developed on the basis of the influenza VLP produced in various expression systems. This provides great advantages in comparison with existing methods of vaccine production. Such vaccines induced full humoral and cellular immune response in animals and humans. This review is focused on the literature concerning the influenza VLPs obtained in various expression systems including insect, mammalian and plant cells.

Key words: *influenza, virus-like particles, vaccine, expression system*

1. ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа представляет собой большую угрозу для здоровья человека. По данным ВОЗ, ежегодно от последствий гриппозной инфекции во всем мире умирает от 250 до 500 тыс. человек, а пандемия может унести миллионы жизней [24]. Для предупреждения заболевания лучшим на сегодняшний день методом является вакцинация. Для накопления вирусной биомассы в производстве современных противогриппозных вакцин используют в основном 10–11-дневные развивающиеся куриные эмбрионы. Однако эта технология имеет ряд недостатков, к числу которых можно отнести длинный и сложный цикл производства, ограниченные возможности для его масштабирования, а также повышенную чувствительность многих людей к куриному белку – овальбумину, который, как известно, является сильным аллергеном. Кроме того, подобные противогриппозные вакцины способны индуцировать лишь штаммоспецифический иммунитет [12]. Ограничения связаны и с проблемами при получении вакцин для профилактики высокопатогенного вируса гриппа птиц, который вызывает гибель куриных эмбрионов [22]. Для решения этой задачи необходима разработка альтернативных способов создания противогриппозных вакцин, не требующих использования эмбрионов. Одним из таких многообещающих и перспективных подходов является получение вакцин на основе гриппозных вирусоподобных частиц (ВПЧ).

Вирус гриппа принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*, вирионы покрыты липидной оболочкой и содержат сегментированный РНК-геном отрицательной полярности. На поверхности частиц представлены два мажорных гликопротеина – гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), а также минорный белок M2. Известно, что частицы вируса гриппа собираются в липидной области апикальной мембраны инфицированных клеток и освобождаются в межклеточное пространство путем почкования [3, 28, 36], что является сложным многоступенчатым процессом [20].

Вирусные структурные белки могут в процессе самосборки объединяться в организованные макромолекулярные структуры (капсиды), по своему строению и морфологии схожие с аутентичными вирионами и содержащие функционально активные и иммунологически соответствующие структурные белки. Гликопротеи-

Контактная информация:
Петухова Наталья Витальевна, науч. сотр.; e-mail: petukhovanv@genebee.msu.ru

ны в составе ВПЧ находятся в нативной конформации, следовательно, эпитопы на поверхности белков презентируются клеткам иммунной системы так же, как и на "живых" вирионах, что важно при клиническом применении ВПЧ [24]. Однако в отличие от вируса дикого типа ВПЧ не содержат вирусную нуклеиновую кислоту и поэтому являются неинфекционными. ВПЧ могут продуцироваться в различных экспрессионных системах [48]. При иммунизации ВПЧ стимулируют дендритные клетки, которые захватывают соответствующие антигены для презентации Т- и В-лимфоцитам [44].

В течение последних 20 лет ведутся поиски новых способов получения гриппозных ВПЧ. Впервые такие частицы были выделены из культуры клеток млекопитающих при совместной экспрессии кДНК-копий генов всех белков вируса гриппа [34].

Доминирующая модель образования частиц вируса гриппа предполагает, что для формирования гриппозных ВПЧ ключевую роль играет матриксный белок М1. Он связывается с липидным участком апикального домена клеточной плазматической мембраны. Далее, взаимодействуя с цитоплазматическими хвостами поверхностных гликопротеинов вируса гриппа, (НА и NA), а также с другими белками плазматической мембраны, белок М1 инициирует сборку вирионов. Их почкование приводит к последующему высвобождению ВПЧ, содержащих липидную мембрану клетки-хозяина со встроенными в нее трансмембранными белками вируса гриппа: НА, NA и М2 [3, 16, 28].

В недавних исследованиях была проведена переоценка минимальных требований для сборки и формирования гриппозных ВПЧ. Так, из растений были выделены ВПЧ, содержащие только НА [9], а в клетках млекопитающих НЕК-293Т были получены ВПЧ, состоящие только из NA вирусов гриппа человека H1N1 и птиц H5N1 [21]. Последние работы также свидетельствуют о том, что НА и NA, но не М1, необходимы для сборки и почкования ВПЧ вируса гриппа в клетках HeLa, при этом уровень продукции ВПЧ при экспрессии белка М1 снижался [6]. Эти различия в полученных данных могут быть связаны с особенностями векторов, использованных для экспрессии, дальнейшие исследования покажут значение каждого вирусного компонента для процесса почкования ВПЧ [24]. Выбор экспрессионной системы для получения иммуногенных белков, в том числе вакцин, играет немаловажную роль и должен соответствовать ряду критериев, предъявляемых к ней при практическом применении [35].

В настоящем обзоре представлен анализ литературы, посвященной современному состоянию разработки сезонных и пандемических противогриппозных вакцин на основе ВПЧ, полученных в клетках насекомых, млекопитающих и растений.

Получение гриппозных ВПЧ в клетках насекомых

Для продукции гриппозных ВПЧ наиболее широко применяются бакуловирусная экспрессионная система в клетках насекомых [28, 39]. Для создания рекомбинантного вектора чаще всего используется вирус множественного ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographia californica* (AcMNPV). Этот бакуловирус инфицирует более 30 других видов насекомых, а также хорошо накапливается в культуре многих клеточных линий. Для работы с рекомбинантным AcMNPV обычно используют линии клеток Sf9, полученные из яичника гусениц *Spodoptera frugiperda*. Двухцепочечная кольцевая ДНК бакуловирусов кодирует белок полиэдрин, который синтезируется в больших количествах, так как промотор гена полиэдрина чрезвычайно сильный. Он обеспечивает синтез многих вирусных белков в поздних стадиях инфекции, а цикл развития вируса не зависит от наличия самого гена. Поэтому экспрессия чужеродного гена под контролем промотора гена полиэдрина дает исключительно высокий уровень синтеза гетерологичного белка [1, 2], что позволяет легко масштабировать процесс производства вакцины [7, 52].

В клетках млекопитающих для эффективного высвобождения гриппозных ВПЧ, содержащих НА, в культуральную среду требуется или совместная экспрессия NA, или добавление экзогенной NA. Активная NA необходима для расщепления сиаловых кислот на поверхности клеточной мембраны, а следовательно, и для высвобождения НА вместе с отпочковывающимися частицами [3, 6]. В клетках насекомых гриппозные ВПЧ могут быть эффективно получены даже в отсутствие экспрессии NA [13, 17, 37, 41]. Это связано с тем, что в клетках насекомых сиаловые кислоты не взаимодействуют с N-гликанами в процессе посттрансляционной модификации [27]. Поверхностные гриппозные антигены в составе ВПЧ, полученных с помощью рекомбинантных бакуловирусов, имели нативную форму, были высокоиммуногенными для животных, индуцировали выработку антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител, а также эффекторов клеточного иммунного ответа. Вакцина на основе гриппозных ВПЧ способна вызывать протективный иммунитет против как гомологичных, так и гетерологичных штаммов вируса гриппа [37].

Таким образом, бакуловирусная система экспрессии имеет множество преимуществ перед другими экспрессионными системами для производства вакцин, а именно: высокий уровень экспрессии, отсутствие ограничений в размере экспрессируемого белка, эффективное расщепление сигнальных пептидов, процессинг белков, включающий посттрансляционные модификации (гликозилирование, фосфорилирование), одновременную экспрессию нескольких генов, короткое время продукции белка [45].

В клетках насекомых, трансфицированных рекомбинантным бакуловирусным вектором, были получены гриппозные ВПЧ, содержащие одновременно 4 структурных белка вируса гриппа – НА, NA, М1 и М2 [28,32], 3 белка – НА, NA и М1 [4, 5, 8, 9, 23, 38, 40], а также 2 белка – НА и М1 [13, 41, 42, 53].

Первое сообщение о протективном действии гриппозных ВПЧ, содержащих М1 и НА, полученных из штамма A/Udorn/72 (H3N2), появилось в 2005 г. [13]. Мыши, иммунизированные внутримышечно или интраназально гриппозными ВПЧ, содержащими 1 мкг НА, при наличии или отсутствии IL-12, были защищены от летальной инфекции после заражения гетерологичным, адаптированным к мышам вирусом гриппа A/HongKong/68 (H3N2). ВПЧ, содержащие белки М1/НА, полученные из штамма A/PR/8/34 (H1N1), обеспечивали защиту от гетерологичного и гомологичного штаммов (A/Puerto Rico8/34, A/WSN/33) [41]. Внутримышечная иммунизация мышей гриппозными ВПЧ, содержащими НА и NA из штамма A/Fujian/411/2002 (H3N2), индуцировала выработку антител, реагирующих не только с гомологичным штаммом, но и с дрейфовыми вариантами вируса в отличие от иммунизации цельновирионной гриппозной вакциной или рекомбинантным НА [4]. Эти результаты подтверждают, что гриппозные ВПЧ способны индуцировать как Th1, так и Th2 иммунный ответ.

Также были получены ВПЧ, содержащие НА и NA вируса гриппа птиц субтипа Н5, например из штамма A/Indonesia/05/2005 (H5N1). Две дозы ВПЧ, содержащих 3 мкг или 600 нг НА, обеспечивали широкий иммунный ответ, который защищал мышей от заражения как гомологичным (A/Indonesia/05/2005), так и гетерологичным вирусом A/Vietnam/1203/2004 [5]. Чтобы усилить протективный иммунитет против различных клайдов высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1, были получены ВПЧ, содержащие смесь НА субтипа из вирусов птичьего гриппа, принадлежащих к клайдам 1 и 2 соответствен-

но: A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) и A/Indonesia/05/2005 (H5N1). Мыши, иммунизированные бивалентной вакциной, индуцировали выработку антигемагглютинирующих антител, перекрестно реагирующих не только с вирусами упомянутых клайдов, но и с вирусом клайда 2.3 (A/Anhui/1/2005). Кроме того, гриппозные ВПЧ, содержащие НА из штамма A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), были способны индуцировать у мышей длительный В- и Т-клеточный протективный иммунитет [23]. Была исследована иммуногенность бивалентных ВПЧ, содержавших смесь H1 и H3, в этом случае масштаб защиты был штаммоспецифичным [42]. В другой работе бакуловирусы, экспрессирующие белки НА и М1 пандемического вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1), были использованы для получения гриппозных ВПЧ в клетках насекомых Sf9 [43]. В опытах на мышах было показано, что однократная внутримышечная иммунизация этой вакциной обеспечивала не только полную защиту от последующего летального заражения гомологичным вирусом A/California/04/2009, но и частичную защиту от антигенно далекого человеческого изолята вируса A/PR/8/34 (H1N1).

Для оценки роли высококонсервативного белка М2 вируса гриппа в индукции перекрестной защиты против гетерологичных вирусов при экспрессии генов М1 и М2 в клетках насекомых были получены ВПЧ, содержащие М2 из вируса гриппа A/WSN/33 (H1N1) в мембранносвязанной форме (М2-ВПЧ) [50]. Белок М2 встраивается в структуру ВПЧ в нативной тетрамерной форме при почковании на поверхности клетки [19]. Интраназальная иммунизация мышей вакциной М2-ВПЧ индуцировала выработку антител, специфичных к М2, которые связывались с вирионами различных штаммов, в том числе A/ Puerto Rico/8/34 (H1N1) и гетеросубтипичным вирусом A/Philippines/82 (H3N2). Важно подчеркнуть, что сыворотка против М2-ВПЧ также показала высокую перекрестную реактивность с вирусом гриппа птиц A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) и свиней A/California/04/2009 (H1N1). Аминокислотная последовательность белков М2 этих вирусов отличается от таковой белка вируса A/WSN/33 (H1N1), использованного для вакцинации [50].

Для усиления иммуногенности гриппозных ВПЧ были предприняты попытки ввести в структуру ВПЧ молекулы, стимулирующие иммунитет. Так, присутствие рекомбинантного флагеллина (известного лиганда для Toll5-подобных рецепторов) в составе гриппозных ВПЧ, содержащих НА вируса гриппа A/ Puerto Rico/8/34 (H1N1), существенно усиливало их иммуногенность и протективную эффективность после заражения иммунизированных мышей гетерологичным штаммом вируса гриппа [53].

Иммуногенные и протективные свойства ВПЧ вируса гриппа, полученных в клетках насекомых, были изучены не только на модели мышей, но и на хорьках – животных, у которых патогенез гриппозной инфекции наиболее близок к проявлениям гриппа у человека. Было показано, что иммунизация гриппозными ВПЧ, содержащими НА от штамма A/Indonesia/05/2005 (H5N1), после двух внутримышечных инъекций защищала животных от заражения гомологичным и гетерологичным вирусами даже при низкой дозе (0,6 мкг НА) [30].

Гриппозные ВПЧ, полученные в клетках Sf9 и содержащие белки НА, NA и М1 вируса гриппа птиц субтипа H5N1 (A/Indonesia/05/2005), использовали для внутримышечной вакцинации людей. Качественная оценка эпитопного спектра и авидности антител показала, что ВПЧ индуцировали выработку антител, которые преимущественно связывались на поверхности вирусных частиц с олигомерной, а не мономерной формой рекомбинантного НА [25]. Полученные результаты позволяют предположить, что выработка разнообразных конформационных антител к поверхностным белкам вируса гриппа вносит существенный вклад в перекрестный иммунный ответ у людей после введения вакцин на основе ВПЧ.

Недавно в клетках Sf9 были получены ВПЧ, содержащие НА от трех субтипов вируса гриппа птиц, потенциально опасных для человека: H5N1, H7N2 и H2N3 [39]. В опытах на хорьках такие ВПЧ были иммуногенными и защищали животных от заражения всеми тремя потенциально пандемическими вирусами. Аналогичные результаты показали ВПЧ, включавшие НА от штаммов A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1), A/New York/55/2004 (H3N2), а также от вируса гриппа В (B/Shanghai/367/2002). Использование мультисубтипичных ВПЧ эффективно защищает от инфекции как сезонными, так и пандемическими вирусами гриппа, при этом исключается необходимость получения вакцин отдельно против каждого из штаммов.

Компания "Novavax" (США), используя бакуловирусную экспрессионную систему, разработала промышленную технологию получения рекомбинантной сезонной или пандемической гриппозной ВПЧ-вакцины в клетках насекомых в соответствии с требованиями GMP (Good Manufacturing Practice). По данным 5 клинических испытаний, такая вакцина соответствует требованиям стандартов безопасности и иммуногенности.

Получение ВПЧ вируса гриппа в клетках млекопитающих

Экспрессия в клетках насекомых белков вируса гриппа приводит к накоплению в культуральной жидкости не только гриппозных ВПЧ, но и бакуловирусов, количество которых превышает 10^8 БО Е/мл. Сходство размеров частиц вызывает проблемы с дальнейшей очисткой ВПЧ. Кроме того, эта технология должна включать этап инактивациии бакуловирусной ДНК, что может сказаться на качестве конечного продукта. В клетках млекопитающих репликации бакуловирусов не происходит и вирусное потомство не образуется. В 1995 г. было описано применение бакуловирусного вектора для доставки чужеродных генов в гепатоциты [18]. Система экспрессии белка в клетках млекопитающих на основе модифицированного бакуловируса AcMNPV получила название BacMamBV. Она не токсична для клеток млекопитающих и проста в применении.

После трансдукции клеток млекопитающих 293T вектором BacMam, содержавшим экспрессионные кассеты, в которых 3 цитомегаловирусных промотора запускали экспрессию белков НА, NA, и М1 вируса A/PR/8/34, были получены гриппозные ВПЧ. При двукратной иммунизации мышей BALB/c ВПЧ индуцировали протективный специфический иммунный ответ и обеспечивали полную защиту животных от летального заражения гомологичным вирусом гриппа. Единственным препятствием при использовании бакуловирусов в качестве вектора для доставки генов, по мнению авторов, является тот факт, что он может индуцировать иммунный ответ против исходного бакуловируса, который будет ограничивать его повторное использование [51].

Гриппозные ВПЧ могут быть получены в клетках млекопитающих с помощью плазмидной трансфекции и без использования бакуловирусной системы. Так, эффективная продукция гриппозных ВПЧ наблюдалась в клетках Vero при совместной экспрессии вирусных белков НА, NA, М1 и М2 [54]. Двукратная вакцинация подобными ВПЧ обеспечивала полную защиту мышей BALB/c от заражения летальной дозой гомологичного штамма. Следует отметить, что технология продукции в клетках Vero гриппозных ВПЧ с помощью плазмидной трансфекции имеет ограниченные возможности для масштабирования.

Иммуногенные свойства консенсусного НА вируса гриппа птиц в составе ВПЧ, полученных в перевиваемой культуре клеток почек эмбрионов человека (HEK-293T), были исследованы на мышах и хорьках [14,15]. При созда-

нии последовательности с помощью метода, получившего название "консенсусная оптимизация антигенов широкого спектра действия" (computationally optimized broadly reactive antigen – COBRA), были использованы последовательности НА вируса гриппа птиц субтипа H5N1 клайда 2, выделенного от людей за период с 2004 по 2006 г. Нуклеотидная последовательность гена COBRA-НА была оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих. Далее клетки HEK-293T были трансфицированы плазмидами, кодирующими белки M1 (A/Puerto Rico/8/1934), NA (A/Thailand/1(KAN-1)/2004) и COBRA-НА. Внутримышечная иммунизация мышей или хорьков гриппозными ВПЧ, содержащими COBRA-НА, приводила к индукции антител, перекрестно реагирующих с тестовым рекомбинантным НА не только из клайда 1, но и из различных субклайдов клайда 2. Все животные, иммунизированные ВПЧ COBRA-НА, были защищены от летального заражения высокопатогенным вирусом гриппа птиц из клайда 2.2. Эти исследования подтверждают, что антиген COBRA-НА представляет собой полностью функциональную молекулу, а гриппозные ВПЧ, полученные на ее основе, являются перспективными для разработки вакцин, индуцирующих протективный иммунитет не только к гомологичному, но и к дрейфовым вариантам вируса гриппа птиц.

Получение ВПЧ вируса гриппа в клетках растений

Использование растений в качестве экспрессионной системы для продукции рекомбинантных белков и создания вакцин имеет ряд преимуществ: высокий выход продукта, биобезопасность (исключена контаминация патогенами человека и животных), низкую стоимость и быстроту производства, возможность его масштабирования. Растения способны экспрессировать функционально активные белки в правильной конформации (корректный фолдинг и посттрансляционные модификации, сходные с таковыми в клетках млекопитающих) [55]. При экспрессии гликозилированных антигенов растительная система имеет дополнительное достоинство – специфичные для растений N-гликаны, которые могут выступать в качестве адъюванта при иммунизации, стимулируя антигенпрезентирующие клетки [46]. Различные ВПЧ были успешно получены в растениях [48]. Следует отметить, что растения являются идеальными хозяевами для получения гриппозных ВПЧ, содержащих только НА. Это связано с тем, что в клетках растений не синтезируются сиаловые кислоты [29, 46, 49], следовательно, для высвобождения почкующихся ВПЧ на поверхности плазматической мембраны клеток растений не требуется присутствие NA.

Группой ученых были получены гриппозные ВПЧ, содержащие НА вируса гриппа птиц A/Indonesia/05/2005 (H5N1) – НА5-ВПЧ-вакцина. Авторы использовали технологию временной экспрессии НА5 в растении *Nicotiana benthamiana* после инфильтрации листьев грамотрицательной почвенной бактерией *Agrobacterium tumefaciens*. Анализ липидного состава ВПЧ НА5, очищенных от примесей, показал, что их оболочка формируется из плазматической мембраны растительной клетки. Гриппозные ВПЧ, полученные в растении, почкуются на плазматической мембране, как и вирус гриппа [9]. В растениях *N. benthamiana* были получены ВПЧ, образованные и другими НА вируса гриппа А, включая H2, H3, H6, H9, а также НА вируса гриппа В [10].

Испытания кандидатной вакцины НА5-ВПЧ на мышах показали, что внутримышечное или интраназальное введение двух доз НА5-ВПЧ в присутствии или в отсутствие адъюванта (алюминий для внутримышечного введения и хитозан для интраназального введения) индуцировало, по данным реакции торможения гемагглютинации (РТГА), более сильную выработку анти-НА-антител, чем тот же самый НА субтипа H5, но не собранный в структуру ВПЧ. Две внутримышечные дозы всего лишь по 0,1 мкг НА5-ВПЧ активировали иммунный ответ со средним титром антител в РТГА выше 1:40. Было установлено, что 100% мышей, вакцинированных двумя дозами по 0,5 мкг НА5-ВПЧ, выжили после летального заражения гетерологичным вирусом A/Vietnam/1194/04 (H5N1) [9]. Вакцинация 1 мкг ВПЧ защищала мышей от 10 летальных доз другого гетерологичного вируса штамма A/Turkey/582/06 (H5N1). Была также продемонстрирована способность ВПЧ вызывать перекрестно-реактивный иммунитет против гетерологичных штаммов и клайдов вируса гриппа H5N1 [10].

Исследования на хорьках растительной вакцины НА5-ВПЧ A/Indonesia/05/2005 (H5N1) показали, что ее иммуногенные и протективные свойства соответствуют критериям European Committee of Medicinal Products for Human Use [33]. Результаты клинических испытаний на людях свидетельствовали о безопасности и иммуногенности вакцины. Побочные реакции были меньше среднего показателя и самостоятельно проходили. Боль в месте инъекции была наиболее частым эффектом у 70% вакцинированных лиц и у 50% в группе плацебо. Аллергические реакции отсутствовали. Растительная вакцина не вызывала существенное увеличение уровня натуральных сывороточных антител к углеводным компонентам клеток растений, входящих в состав вакцины [26].

Многообещающим достоинством получения гриппозных ВПЧ в клетках растений, особенно перед угрозой пандемии, являются высокая продуктивность и быстрота масштабирования процесса. Вакцину на основе ВПЧ можно произвести в растениях в течение 21 дня [11]. Высокий уровень синтеза рекомбинантного белка достигается в течение 5–11 дней после агроинфильтрации листьев *N. benthamiana* [31,47]. Результаты доклинических и клинических испытаний вакцины НА5-ВПЧ доказали ее безопасность и эффективность.

Заключение

ВПЧ вируса гриппа представляют собой оригинальную структуру, подобную нативным вирусным частицам, содержащую липидную оболочку и связанные с мембраной поверхностные гликопротеины. К основным достоинствам ВПЧ-вакцин по сравнению с традиционными современными гриппозными вакцинами можно отнести следующие особенности: 1) время производства ВПЧ-вакцины сведено к минимуму (в пределах 1 мес); 2) ВПЧ сохраняют нативную структуру белков, сравнимую с белками дикого штамма вируса гриппа; 3) для получения ВПЧ-вакцины не используются куриные эмбрионы; 4) при получении ВПЧ-вакцины не применяется инфекционный или высокопатогенный штамм вируса гриппа; 5) масштабирование технологического процесса получения ВПЧ-вакцин отличается быстротой и гибкостью.

Неинфекционные гриппозные ВПЧ после интраназального или внутримышечного введения могут обеспечить защиту не только от гомологичных, но и от дрейфовых вариантов, а также гетерологичных вирусов гриппа типа А. ВПЧ индуцируют как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, играющий ведущую роль в расширении субтипического спектра защиты. В настоящем обзоре представлены результаты доклинических и клинических исследований, которые впервые дают оценку качества эпитопного спектра и авидности антител, индуцированных ВПЧ-вакциной у людей. Таким образом, получение гриппозных ВПЧ представляет собой перспективную и привлекательную стратегию разработки безопасной и эффективной вакцины и контроля над распространением как сезонного, так и пандемического вируса гриппа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белжеларская С.Н.* Бакуловирусные системы экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых и млекопитающих. Молекулярная биология. 2011; 1: 142–59.
2. *Глик Б., Пастернак Д.* Молекулярная биология. Принципы и применение. М.: Мир; 2002.
3. *Ali A., Avalos R.T., Ponimaskin E., Nayak D.P.* Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. J. Virol. 2000; 74: 8709–19.
4. *Bright R.A., Carter D.M., Daniluk S., Toapanta F.R., Ahmad A., Gavrilov V.* et al. Influenza virus like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. Vaccine. 2007; 25 (19): 3871–78.
5. *Bright R.A., Carter D.M., Crevar C.J., Toapanta F.R., Steckbeck J.D., Cole K.S.* et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. PLoS ONE. 2008; 3 (1): e1501.
6. *Chen B.J., Leser G.P., Morita E., Lamb R.A.* Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. J. Virol. 2007; 81 (13): 7111–23.
7. *Cox M.M.J., Hashimoto Y.* A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. J. of Inverteb. Pathol. 2011; 107: S31–1.
8. *Crevar C.J., Ross T.M.* Elicitation of protective immune responses using a bivalent H5N1 VLP vaccine. Virol. J. 2008; 5: 131.
9. *D'Aoust M.-A., Lavoie P.O., Couture M.M.-J., Trepanier S., Guay J.M., Dargis M.* et al. Influenza virus-like particles produced by transient expression in Nicotiana benthamiana induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. Plant Biotechnol. J. 2008; 6: 930–40.
10. *D'Aoust M.-A., Couture M., Ors F., Trepanier S., Lavoie P.-O., Dargis M., Vezina L.-P.* Recombinant influenza virus-like particles (VLPs) produced in transgenic plants expressing hemagglutinin. International Patent application, WO2009/076778; 2009.
11. *D'Aoust M.-A., Couture M.M., Charland N., Trépanier S., Landry N., Ors F., Vézina L.P.* The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. Plant Biotechnol. J. 2010; 8: 607–19.
12. *Du L., Zhou Y., Jiang S.* Research and development of universal influenza vaccines. Microb. Infect. 2010; 12: 280–6.
13. *Galarza J.M., Latham T., Cupo A.* Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. Viral Immunol. 2005; 18 (1): 244–51.
14. *Giles B.M., Ross T.M.* A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets. Vaccine. 2011; 29: 3043–54.
15. *Gilesa B.M., Bissel S.J., Dealmeida D.R., Wiley C.A., Ross T.M.* Antibody breadth and protective efficacy are increased by vaccination with computationally optimized hemagglutinin but not with polyvalent hemagglutinin-based H5N1 virus-like particle vaccines. Clin. Vaccine Immunol. 2012; 19 (2): 128–39.
16. *Gomez-Puertas P., Albo C., Perez-Pastrana E., Vivo A., Portela A.* Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. J. Virol. 2000; 74 (24): 11538–47.
17. *Guo L., Lu X., Kang S.M., Chen C., Compans R.W., Yao Q.* Enhancement of mucosal immune responses by chimeric influenza HA/SHIV virus-like particles. Virology. 2003; 313 (2): 502–13.
18. *Hofmann C., Sandig V., Jennings G., Rudolph M., Schlag P., Strauss M.* Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92 (22): 10099-103.
19. *Holsinger L.J., Lamb R.A.* Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. Virology. 1991; 183: 32–43.
20. *Rossman J. S., Lamb R.A.* Influenza virus assembly and budding. Virology, 2011; 411: 229–36.
21. *Lai J.C.C., Chan W.W.L., Kien F., Nicholls J.M., Peiris J.S.M., Garcia J.-M.* Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively expressing influenza neuraminidase. J. Gen. Virol. 2010; 91: 2322–30.
22. *Johansson B.E., Brett I.C.* Changing perspective on immunization against influenza. Vaccine. 2007; 25 (16): 3062–65.
23. *Kang S.M., Yoo D.G., Lipatov A.S., Song J.M., Davis C.T., Quan F.S.* et al. Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles. PLoS ONE. 2009; 4 (3): e4667.
24. *Kang S.M., Song J.-M., Quan F.-S., Compans R.W.* Influenza vaccines based on virus-like particles. Virus Res. 2009; 143: 140–46.
25. *Khurana S., Wu J., Verma N., Verma S.* H5N1 virus-like particle vaccine elicits cross-reactive neutralizing antibodies that preferentially bind to the oligomeric form of Influenza virus hemagglutinin in humans. J. Virol. 2011; 85 (21): 10945–54.
26. *Landry N., Ward B.J., Trépanier S., Montomoli E.* Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 Influenza. PLoS ONE. 2010; 5: I.12.
27. *Lanford R.E., Luckow V., Kennedy R.C., Dreesman G.R., Notvall L., Summers M.D.* Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system. J. Virol. 1989; 63 (4): 1549–57.
28. *Latham T., Galarza J.M.* Formation of wild-type and chimeric influenza virus like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. J. Virol. 2001; 75 (13): 6154–65.
29. *Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fischette-Laine´ A.C., Gomord V., Faye L.* N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. Plant Molecular Biol. 1998; 38: 31–48.
30. *Mahmood K., Bright R.A., Mytle N., Carter D.M., Crevar C.J., Achenbach J.E.* et al. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. Vaccine. 2008; 26 (42): 5393–99.
31. *Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y.* Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. Nat. Biotechnol. 2005; 23: 718–23.
32. *Matassov D., Cupo A., Galarza J.M.* A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1). Viral Immunol. 2007; 20 (3): 441–52.
33. Medicago's avian flu pandemic vaccine achieves 100% protection in a lethal challenge study in ferrets. 2009. URL http://www.medicago.com/English/news/News-Releases/News-ReleaseDetails/2009/Medicagos Avianflupandemicvaccineachieves100protectioninalethalchallengestudyinferrets1120905/default.aspx [accessed on 27 August 2009].
34. *Mena I., Vivo A., Perez E., Portela A.* Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids. J. Virol. 1996; 70: 5016–24.
35. *Mett V., Farrance C.E., Green B.J., Yusibov V.* Plants as biofactories. Biologicals. 2008; 36: 354–58.
36. *Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H., Barman S.* Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res. 2009; 143: 147–61.
37. *Pan Y.-S., Wei H.-J., Chang C.-C., Lin C.-H., Wei T.-S., Wu S.-C., Chang D.-K.* Construction and characterization of insect cell-derived Influenza VLP: cell binding, fusion, and EGFP incorporation. J. Biomed. Biotechnol. 2010; 2010: Article ID 506363. doi:10.1155/2010/506363.
38. *Pushko P., Tumpey T.M., Bu F., Knell J., Robinson R., Smith G.* Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. Vaccine. 2005; 23 (50): 5751–9.
39. *Pushko P., Pearce M.B., Ahmad A., Tretyakova I.* Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes. Vaccine. 2011; 29 (35): 5911–8.
40. *Pushko P., Tumpey T.M., Van Hoeven N., Belser J.A., Robinson R., Nathan, M.* et al. Evaluation of influenza virus-like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian influenza. Vaccine. 2007; 25 (21): 4283–90.
41. *Quan F.S., Huang C., Compans R.W., Kang S.M.,* Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. J. Virol. 2007; 81 (7): 3514–24.
42. *Quan F.S., Steinhauer D., Huang C., Ross T.M., Compans R.W., Kang S.M.* A bivalent influenza VLP vaccine confers complete inhibition of virus replication in lungs. Vaccine. 2008; 26 (26): 3352–61.
43. *Quan F.-S., Vunnava A., Compans R.W., Kang S.-M.* Virus-like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic Influenza virus in mice. PLoS ONE. 2010; 5 (I.2): e9161.
44. *Roy P., Noad R.* Virus-like particles as a vaccine delivery system. Myths and facts. Hum. Vaccines. 2008; 4 (1): 5–8.
45. *Roy B., Liang S., Zhang P., Wang M.-X., Zhou F., David W.C.C., Miao Y.* Probability to produce animal vaccines in insect baculovirus expression system. Afr. J. of Biotechnol. 2011; 10 (51): 10323–9.
46. *Saint-Jore-Dupas C., Faye L., Gomord V.* From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. Trends Biotechnol. 2007; 25: 317–23.
47. *Sainsbury F., Lomonossoff G.P.* Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. Plant Physiol. 2008; 148: 1212–8.
48. *Santi L., Huang Z., Mason H.* Virus-like particles production in green plants. Methods. 2006; 40 (1): 66–76.
49. *Seveno M., Bardor M., Paccalet T., Gomord V., Lerouge P., Faye L.* Glycoprotein sialylation in plants? Nat. Biotechnol. 2004; 22: 1351–52.
50. *Song J.-M., Wang B.-Z., Park K.-M., Rooijen N.V., Quan F.-S., Kim M.-C.* et al. Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity, PLoS ONE. 2011; 6 (1): e14538.
51. *Tang X.-C., Lu H.-R., Ross T.M.* Baculovirus-produced Influenza virus-like particles in mammalian cells protect mice from lethal Influenza challenge. Viral Immunol. 2011; 24 (4): 311–9.
52. *Vicente T., Roldao A., Peixoto C., Carrondo M.J.T., Alves P.M.* Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, V.107, S42–S48.
53. *Wang B.-Z., Quan F.-S., Kang S.-M., Bozja J., Skountzou I., Richard W.* Incorporation of membrane-anchored flagellin into Influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. J. Virol. 2008; 82: 11813–23.
54. *Wu C.Y., Yeh Y.C., Yang Y.C., Chou C.* Mammalian expression of virus-like particles for advanced mimicry of authentic Influenza virus. PLoS ONE. 2010; 5: I.3.
55. *Yusibov V., Streatfield S.J., Kushnir N.* Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals. Vaccines, antibodies and beyond. Hum. Vaccines. 2011; 7 (3): 313–21.

Поступила 15.05.12