

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«НИЖЕГОРОДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА  
И.Н. БЛОХИНОЙ»  
(ФБУН ННИИЭМ ИМ.АКАДЕМИКА И.Н.БЛОХИНОЙ РОСПОТРЕБНАДЗОРА)

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

**СЛИТЫЕ БЕЛКИ КАК ОСНОВА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН**

**Нижний Новгород, 2022**

Слитые белки как основа противовирусных вакцин. Аналитический обзор. ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, 2022. – 47 с.

Аналитический обзор предназначен для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также для специалистов медицинских организаций, образовательных организаций медицинского профиля и научно-исследовательских учреждений.

Авторы аналитического обзора – сотрудники ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора:

Новиков Д.В., к.б.н., доцент

Цыганова М.И., к.б.н.

Новиков В.В., д.б.н., профессор

Рецензенты:

– Талаев В.Ю., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора

– Селиванова С.Г., к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора

Одобрено решением Учёного совета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (протокол № 6 от 23 июня 2022 г.).

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1. Стратегии разработки вакцин.....	5
2. Технические риски и ограничения разных стратегий получения вакцин.....	6
3. Поливалентные субъединичные вакцины.....	8
4. Белковые адъюванты.....	9
4.1 Ферритин.....	9
4.2 Бактериальный флагеллин.....	10
4.3 Бактериальные липополипротеины.....	12
4.4 Фибронектины.....	12
4.5 Белки теплового шока.....	13
5. Использование слитых белков для конструирования вирусоподобных частиц.....	16
Заключение.....	26
Список литературы.....	27

## Введение

Вакцины — это биологические препараты, предназначенные для индукции безопасного иммунологического ответа, позволяющего защитить организм от болезней [1]. В идеале вакцины представляют собой лекарства, которые можно безопасно использовать для создания длительного профилактического и терапевтического иммунного ответа, что является одним из наиболее важных инструментов поддержания медицинского благополучия настоящего и будущих поколений людей [2]. В глобальном масштабе вакцины доказали свою эффективность в снижении смертности и заболеваемости, вызываемых многими инфекциями. Подсчитано, что вакцины ежегодно предотвращают около 2,5 миллионов смертей во всем мире или около 7000 смертей в день [3]. Эффективность вакцины определяется входящими в ее состав антигенами, содержащими Т- и В-клеточные эпитопы [4].

Традиционные подходы к разработке вакцин (живые аттенуированные или инактивированные вакцины) привели к созданию обширного перечня профилактических препаратов против заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. Однако для многих сложных патогенов, таких как вирусы с высокой антигенной изменчивостью, традиционные подходы не позволили создать эффективные вакцины [5–7]. Кроме того, традиционные подходы не дают возможности достаточно быстро реагировать на периодически возникающие вспышки новых инфекционных заболеваний. Для получения традиционных вакцин необходимо крупномасштабное производство патогенов, что несет определенные риски по их попаданию в окружающую среду. Для преодоления этих ограничений необходима разработка стратегий получения надежных, безопасных и недорогих в производстве вакцин.

Благодаря недавним достижениям в области структурной биологии, молекулярной биологии и иммунологии рациональный дизайн вакцин стал очень активным направлением исследований. Дизайн вакцин, основанный на анализе структуры антигенов, также известный как структурная вакцинология, направлен на конструирование антигенов с нужным строением и свойствами [8–10]. Методы структурной вакцинологии позволяют получать антигены, содержащие только четко определенные эпитопы, необходимые для индукции специфических нейтрализующих антител и Т-клеточного ответа. Кроме того, методология, позволяет получать антигены, слитые с молекулами, усиливающими иммунный ответ. Такая модификация структуры антигена направлена на стабилизацию его конформации, оптимизацию презентации эпитопа, повышение иммуногенности, повышение сроков хранения. Целью настоящей работы явился аналитический обзор

современных достижений в применении слитых антигенов, позволяющих повысить эффективность вакцин, а также анализ преимуществ такого подхода и его ограничений.

## 1. Стратегии разработки вакцин

Традиционные подходы к разработке вакцин опираются на две основные стратегии. Первая - это использование целого патогена: живые патогены в ослабленном состоянии [11], инактивированные или убитые препараты патогенов [12]. Вторая стратегия основана на применении в качестве антигена отдельных компонентов патогена, из которых с использованием различных методологий получают субъединичные вакцины, токсидные вакцины, вакцины на основе вирусоподобных частиц, пептидно-конъюгированные субъединичные вакцины, вакцины на основе нуклеиновых кислот и векторные вакцины (таблица 1).

Таблица 1 – Перечень стратегий, используемых при разработке вакцин

Вид вакцины	Основа вакцины
Инактивированные или убитые вакцины	Патогены, не способные размножаться (вакцины против бешенства, полиомиелита, гепатита А, гриппа и др).
Живые аттенуированные вакцины	Ослабленные патогены, со сниженной вирулентностью (вакцины против кори, свинки, краснухи, оспы, желтой лихорадки и др).
Субъединичные вакцины	Очищенные фрагменты патогенов
Вакцины на основе конъюгатов белков и полисахаридов	Бактериальные полисахариды, конъюгированные с белком носителем (вакцины против гемофильной инфекции, вызванной <i>Haemophilus influenzae</i> (палочка Пфайфера), и пневмококковой инфекции)
Токсидные вакцины (на основе анатоксинов)	Инактивированные микробные экзотоксины (вакцины против коклюша, столбняка, дифтерии).
Вакцины на основе вирусоподобных частиц (ВпЧ)	Вирусные белки, образующие структуры, повторяющие вирион и не содержащие генетический материал (вакцина против вируса папилломы человека).
Вакцины на основе нуклеиновых кислот	ДНК или мРНК, кодирующие белки патогена (вакцина против <i>Sars-Cov-2</i> )
Векторные вакцины	Кодирующий антиген генетический материал, упакованный в неопасный вирус или бактерию (вакцина против <i>Sars-Cov-2</i> )

## 2. Технические риски и ограничения разных стратегий получения вакцин

Вакцины, содержащие убитые или аттенуированные патогены, несут в своем составе полный набор антигенов, что является потенциальным преимуществом, поскольку позволяет добиваться максимального уровня сероконверсии и эффективности защиты. Однако в составе таких вакцин присутствуют дополнительные компоненты, которые могут снижать эффективность вакцины за счет подавления иммунитета против наиболее важных защитных антигенов [13], направлять иммунные реакции на формирование аллергического или неэффективного иммунного ответа [14], а в некоторых случаях могут причинять вред. Например, присутствие в вакцине углеводов группы А и белка М *Streptococcus pyogenes* провоцирует развитие ревматической болезни сердца [15]. Разработка и производство вакцин, состоящих из полноразмерных патогенов, требует их культивирования [16]. Это создает риски, связанные с небезопасностью крупномасштабного получения инфекционных агентов. Еще одним важным фактором, создающим риски, является способность живых аттенуированных вакцин к репликации при поступлении в организм. Это обычно не вызывает проблем у здоровых лиц, но может вызвать тяжелую инфекцию при ослаблении иммунитета, в том числе у пожилых людей. В редких случаях живые аттенуированные вакцины способны к возврату вирулентного состояния, в результате чего у иммунизированных лиц может развиваться заболевание, от которого вакцина должна защитить. Важным ограничением является необходимость бережного хранения и транспортировки вакцины на основе аттенуированного патогена для сохранения его жизнеспособности. Наконец, рекомбинация между различными аттенуированными вакцинными штаммами или между аттенуированными и циркулирующими дикими штаммами патогена может привести к быстрому возникновению вирулентных штаммов [17].

Перечисленные выше риски применения вакцин на основе полного патогена и безуспешность разработки классических вакцин против заболеваний, вызываемых некоторыми важными патогенами (например, вирус иммунодефицита человека или малярийный плазмодий), привели к созданию субъединичных вакцин, содержащих отдельные компоненты патогенов [18]. Такие вакцины обычно содержат в качестве антигенов очищенные белки (анатоксинные вакцины или вирусоподобные частицы), полисахариды, белково-полисахаридные конъюгаты, гликолипиды, липопротеины или их сочетания. Они не содержат инфекционного патогена и производятся с использованием гетерологичных систем экспрессии, синтетических и ферментативных процессов [19, 21]. Субъединичные вакцины обладают многими существенными преимуществами по сравнению с традиционными. К ним относятся повышенная безопасность, специфичность,

постоянство от партии к партии и стабильность при хранении, а также более широкие возможности для создания вакцинных антигенов для направленного иммунного ответа [22].

Однако, несмотря на свои преимущества, субъединичные вакцины, как правило, менее иммуногенны, чем вакцины, состоящие из целых патогенов. Их более простой антигенный состав приводит к потере сигналов опасности для иммунной системы. Они содержат значительно сокращенный репертуар эпитопов, на которые может развиваться иммунный ответ [23]. Использование отдельных пептидов, имитирующих эпитопы, не гарантирует, что большинство иммунизированных людей будут иметь защитный иммунитет. Применение пептидных вакцин также ограничено в случае, когда у патогена присутствует множество различных штаммов или когда строение эпитопа может меняться, не влияя на основные функции антигена [24].

Для решения проблемы антигенного многообразия патогенов применяются поливалентные белковые антигены, которые получают путем слияния множества белковых эпитопов или структур в одну молекулу. Содержащая такой антиген вакцина позволяет вызывать перекрестные защитные реакции против различных штаммов патогена [25].

Для преодоления невысокой иммуногенности субъединичных вакцин их обычно усиливают иммуностимулирующими агентами («адьювантами»). Применяется также многократная иммунизация, что повышает суммарный иммунный ответ в краткосрочной перспективе и поддерживает ослабевающий в течение длительного периода времени иммунный статус [26]. Однако имеется лишь ограниченное количество используемых в лицензированных вакцинах безопасных для человека адьювантов [27].

В то же время во многих исследованиях было продемонстрировано, что слияние антигенов с иммуностимуляторами белковой природы вызывает значительно более сильный иммунный ответ по сравнению с простыми смесями антигена и адьюванта [28-33]. Это связано с тем, что слияние антигена в одну молекулу с белковым адьювантом помогает обеспечить поглощение обоих компонентов одной и той же антигенпрезентирующей клеткой [34], а также способствует оптимальному представлению антигенов молекулами главного комплекса системы гистосовместимости для активации адаптивного иммунного ответа [35]. То есть, адьювантом активируются в таком случае только те антигенпрезентирующие клетки, которые поглотили антиген. В результате могут быть уменьшены дозы адьюванта и антигена и снижен риск побочных эффектов [36]. Напротив, когда адьювант и антиген вводят в виде простой смеси, каждый из компонентов может независимо поглощаться разными антиген-презентирующими клетками. В этом случае меньшее количество антигенпрезентирующих клеток будет встречаться с антигеном и с адьювантом одновременно, что снижает эффективность иммунного ответа и может иметь

нежелательные последствия, такие как развитие иммунологической толерантности или стимуляция адьювантом иммунного ответа против собственных антигенов [32].

В связи с тем, что слияние антигена с адьювантом приводит к значительному усилению иммунного ответа, особенно при стимуляции цитотоксических лимфоцитов, разработка платформ и технологий для слияния антиген-адьювант перспективна для получения вакцин следующего поколения [29, 31, 37]. В большинстве случаев антигенные детерминанты представлены на белках. Методы, обеспечивающие генетическое слияние и экспрессию антигенов, слитых с белковыми адьювантами, достаточно просты и доступны при создании новых вакцин и производстве разработанных. Для таких типов вакцин разработаны крупномасштабные методы производства белков, являющихся их основой [38]. Кроме того, создание новых вариантов слитых белков используется для совершенствования способов доставки антигена к антигенпрезентирующим клеткам. Так, получение вирусоподобных частиц или белковых наночастиц, содержащих слитые белки, позволяет улучшить поглощение и представление антигенов, а также активировать врожденную иммунную систему. При этом сочетание обоих подходов (слияние с адьювантом и формирование наноразмерных структур) дает наилучшие возможности для производства сильнодействующих вакцин [39].

### 3. Поливалентные субъединичные вакцины

К настоящему времени накоплены многочисленные данные о строении Т- и В-клеточных эпитопов, вызывающих протективные иммунные реакции на различные патогены. В дополнение к этому разработаны компьютерные программы, позволяющие на основе структуры белков рассчитывать Т-клеточные эпитопы и эпитопы для протективных или нейтрализующих антител [40]. Такие эпитопы используются для конструирования мультиэпитопных иммуногенов путем их слияния в одну молекулу. Для этого используют два подхода. В рамках первого подхода эпитопы последовательно объединяют в единую молекулу с образованием гибридного полиэпитопного белка. Такой подход нашел применение при создании отечественной вакцины против ВИЧ-1. Авторами с помощью метода фагового дисплея были определены пептиды, которые были использованы как имитаторы Т- и В-клеточных конформационных эпитопов белков env и gag ВИЧ-1. Было показано, что у мышей, стимулированных иммуногеном, состоящим из таких слитых в одну молекулу пептидных эпитопов, происходит наработка антител, нейтрализующих лабораторные штаммы ВИЧ1 [41].

При использовании второго подхода чужеродные эпитопы различных патогенных штаммов или белковых факторов вирулентности интегрируются в белок-носитель



эпитопов. Это делается с таким расчетом, чтобы сохранить нативную конформацию после включения в основной белок. Если в белок-носитель встраивается несколько защитных эпитопов от разных штаммов или геновариантов патогена, то полученный поливалентный антиген с высокой вероятностью будет вызывать перекрестный иммунный ответ. Примером построенного таким образом иммуногена может служить белок VP1 enterovirus 71 (EV71), в который были встроены эпитопы coxsackievirus A16 (CA16). Антитела, полученные после иммунизации таким иммуногеном, защищали новорожденных мышат от летальных доз EV71 и CA16 [42].

#### 4. Белковые адъюванты

##### 4.1 Ферритин

Белковые молекулы, способные к самосборке в крупные регулярные структуры, [43-44], могут быть использованы для создания иммуногенов, имитирующих упорядоченные структуры, несущие массивы антигенов и схожие по строению с природными. Получение самособирающихся структур, несущих необходимые эпитопы антигенов, используется в настоящее время для создания индивидуальных дизайнерских наноразмерных вакцин, в которых учитывается природный дизайн антигенов [45-47].

При разработке таких вакцин широко используется белок ферритин [48]. Ферритин имеется у многих живых организмов, включая бактерии, грибы, растения и животных [49]. Его основная физиологическая функция заключается в хранении железа в нетоксичной форме и обеспечении его биодоступности для клетки путем преобразования в растворимую форму [50]. Он также обеспечивает защитный эффект против токсического воздействия избытка свободного железа, приводящего к генерации реактивных форм кислорода, которые могут нарушать жизнедеятельность клеток и приводить к их гибели [51].

Ферритин является перспективной платформой для презентации антигенов клеткам иммунной системы [52]. Помимо способности к самосборке, белковый комплекс ферритина обладает экстраординарной термической (выдерживает температуры до 80-100°C) и pH-стабильностью (диапазон pH 3-10), монодисперсностью, небольшим однородным размером, биосовместимостью, биоразлагаемостью, дешевой крупномасштабного производства, полыми полостями при сборке и способностью к декорированию поверхности с помощью химических или генно-инженерных подходов [53-54].

С тех пор как Li и др. [52] впервые функционализировали внешнюю поверхность ферритина пептидом Tat ВИЧ-1, многие другие исследования использовали ферритин в качестве системы доставки антигена. Несколько антигенов, состоящих из отдельных коротких пептидов или сложных белков, были успешно экспрессированы совместно с

ферритином и использованы для создания наночастиц, служащих основой создаваемых вакцин [55-56]. Помимо разработки вакцин, ферритин используется в нанобиотехнологии для доставки лекарств, биомиметического синтеза, биовизуализации и клеточного таргетинга [57-60].

#### 4.2 Бактериальный флагеллин

Многие бактерии имеют один или несколько жгутиков, которые отвечают за подвижность бактерий, а также функционируют как сенсоры окружающей среды [61-62]. Жгутики бактерий состоят из трех субструктур: базального тела, крючка и спиральной нити [63]. Базальное тело является мотором, обеспечивающим вращение жгутика, и прикрепляет его к клеточной мембране. Нить представляет собой длинную, полую спиралевидную трубку, которая вращается, передавая энергию для поступательного движения бактериальной клетки. Связывает эти два компонента вместе крючок, который функционирует как гибкий шарнир для передачи крутящего момента от базального тела к нити. Строительными блоками жгутиковой нити являются мономерные молекулы белка флагеллина, которые путем самосборки образуют нить жгутика. Каждый мономер флагеллина состоит из четырех глобулярных доменов (D0-D3) [64]. Из них домены D0 и D1 консервативны, в то время как домены D2 и D3 изменчивы по строению и длине полипептидной цепи у разных видов бактерий. Для флагеллина показана способность формировать нанотрубки. Как мономерный, так и организованный в наноструктуры флагеллин представляет собой патоген-ассоциированную молекулярную структуру, которая является лигандом для Toll-подобного рецептора 5 (TLR5) [65-66]. Кроме того, показано связывание флагеллина с представителями членов семейства Nod-подобных рецепторов (NLR):Nlrc4 и Naip5 [67, 68]. Известно, что флагеллин взаимодействует с TLR5 рецептором как N-концевым доменом D1 [69], так и C-терминальной областью белка [70]. Связывание флагеллина с рецепторами Naip5 и Nlrc4 происходит за счет 35 C-концевых аминокислот домена D0, после чего происходит транслокация флагеллина в цитозоль.[71]. Благодаря связыванию с рецепторами флагеллин способен инициировать врожденные и адаптивные иммунные реакции через множество путей, стимулируя как гуморальный, так и клеточный иммунитет [37].

К настоящему времени опубликовано множество работ по использованию флагеллина в качестве адъюванта при разработке вакцин. В большинстве исследований использовались флагеллины *Salmonella typhimurium* fliC (STF1) или fljB (STF2) либо в виде смеси с антигеном, либо в виде слитых белков [72]. Генетическое слияние антигенов с C- или N-концом флагеллина или химическая конъюгация [73] обеспечивали развитие более

сильного иммунного ответа, в сравнении с использованием простой смеси флагелина с антигеном [74]. Интересно отметить, что слияние антигена с флагеллином в большинстве случаев приводит к активации цитотоксических лимфоцитов. Выбор N- или C-концевого слияния может также влиять на уровень и тип иммунного ответа, вызываемого антигеном. Например, N-концевое слияние белка E7 вируса папилломы человека типа 16 (ВПЧ-16) с белком *fliC S. typhimurium* привело к 10-кратному увеличению стимуляции через TLR5 по сравнению с аналогичным C-концевым слиянием [75]. В то же время C-концевое слияние приводило к активации инфламмосомы через *Nlr4* и вызывало более высокие уровни E7-специфических цитотоксических лимфоцитов, которые эффективно подавляли рост опухолей в модели ВПЧ-16-ассоциированного рака у мышей. В сумме такие свойства флагелина позволяют использовать его не только как носитель, но и как адъювант [18].

Несмотря на описанные выше преимущества, флагеллин высокого качества трудно получить из-за его быстрой протеолитической деградации (особенно C-концевого домена), загрязнений эндотоксинами, иммуномодулирующими нуклеотидами и его склонности к полимеризации [76]. Кроме того, введение флагелина приводит к выработке антител против него самого, что подавляет его иммуностимулирующую активность при использовании в качестве адъюванта при многократных введениях вакцины. Для преодоления этих проблем были предприняты попытки создать измененные формы флагелина (например, путем включения различных мутаций [77], уменьшения размера белка [78] или использования только небольших пептидов, которые сохраняют иммуностимулирующую способность и не влияют на его фармацевтические свойства [79].

Предприняты попытки использовать в качестве вакцины различные антигены, слитые с флагеллином. К ним относятся вакцины против заболеваний, вызванных *Campylobacter* [80], широкий спектр вакцин против вируса гриппа А [81-82], ротавируса [83], *Yersinia pestis* [84] и *S. pneumonia* [85]. Однако использование флагелина имеет свои ограничения из-за его мощной иммуностимулирующей активности, включающей секрецию провоспалительных цитокинов, а также из-за его потенциальной роли в патогенезе воспалительных заболеваний сердечно-сосудистой системы [86], кишечника [87], печени [88], легких [89]. В связи со способностью флагелина стимулировать системный цитокиновый шторм, а также вызывать сильные воспалительные реакции в месте введения высказываются опасения по поводу безопасности его использования в качестве адъюванта в составе вакцин. В то же время данные клинических испытаний показали, что введение очень низких доз белков, слитых с флагеллином (1-10 мкг), сводят к минимуму возможность тяжелых последствий [37]. В целом, результаты клинических испытаний свидетельствуют о том, что большинство побочных эффектов, связанных с введением малых доз слитых с

флагеллином белков, являются легкими (боль в месте инъекции, головная боль, усталость и миалгия) [81].

#### 4.3 Бактериальные липополипротеины

Бактериальные липопротеины представляют собой класс белков, связанных с клеточной стенкой. Они участвуют в клеточной адгезии, метаболизме компонентов клеточной стенки, устойчивости к антибиотикам, в поглощении клеткой питательных веществ, фолдинге белков и передаче трансмембранных сигналов [90]. Зрелые бактериальные липопротеины имеют N-концевой остаток цистеина, который выполняет функцию крепления белков к мембранам бактериальных клеток. Бактериальные липопротеины распознаются хозяином как чужеродные, что приводит к стимуляции врожденного иммунитета через Toll-подобные рецепторы [91, 92]. Бактериальные липопротеины и их синтетические аналоги были предложены в качестве адъювантов для разработки субъединичных вакцин [93]. Показано, что бактериальные липопротеины обладают способностью усиливать антители- и клеточно-опосредованный ответ на слитые с ними антигены, а также могут стимулировать мукозальный иммунитет после их попадания на слизистые поверхности (например, назальным, оральным, легочным или вагинальным путем) [94-97].

Слияние генов, кодирующих целые бактериальные липопротеины или их N-концевые фрагменты, с интересующими антигенами дает возможность, используя технологии экспрессии рекомбинантных белков, напрямую получать белковые вакцины со встроенным липопептидным адъювантом. Однако, несмотря на кажущуюся простоту этого подхода, его широкому применению препятствуют несколько проблем. Экспрессия бактериальных липопротеинов в *Escherichia coli* (*E. coli*) обычно связана с неполным или полным отсутствием липидирования, низким уровнем экспрессии, трудностями очистки рекомбинантного липопротеина от его нелипидированного предшественника или других бактериальных компонентов, а также получением гетерогенных продуктов, содержащих различные модификации липидов [98]. Тем не менее, проводятся доклинические испытания нескольких прототипов вакцин, в составе которых используются антигены, слитые с липополипротеинами [39].

#### 4.4 Фибронектины

Фибронектины – это группа гликопротеинов, которые в избытке присутствуют в плазме крови и внеклеточном матриксе, играют важную роль в клеточной адгезии, дифференцировке, росте и миграции клеток, необходимы для эмбриогенеза и включают функциональные домены, которые связываются с различными молекулами, включая коллаген, фибрин, гепарин и интегрины [99]. Фибронектины состоят из двух мономеров

230-250 кДа, которые включают три типа повторяющихся единиц (FNI, FNII и FNIII) и сшиты через С-концевой участок дисульфидными связями, образуя димеры. Фибронектины кодируются одним геном, при этом у человека наблюдается до двадцати их различных вариантов. Они образуются путем альтернативного сплайсинга мРНК. Кроме того, экспрессируются два различных типа фибронектина. Это клеточный фибронектин, который содержится в тканевом внеклеточном матриксе, и растворимый плазменный фибронектин, который вырабатывается гепатоцитами и составляет большую часть фибронектина в плазме. Из них только клеточный фибронектин включает образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК последовательности, называемые EDA или EDB [100].

Интерес к использованию EDA в качестве адъюванта для противовирусных и противоопухолевых вакцин возник после обнаружения того, что EDA является эндогенным агонистом Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) [101]. Генетическое или химическое слияние антигенов с С- или N-концами EDA позволяло направлять их на TLR4-экспрессирующие дендритные клетки, стимулируя их созревание, активацию NF-κB пути и высвобождение провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-12 [102], что, в свою очередь, приводило к активации Т- и В-лимфоцитов [103].

Для понимания механизмов адъювантной активности EDA фрагмента фибронектина было изучено влияние удлинения его N- и С-концов на иммуностимулирующую активность. Было показано, что при удлинении N-конца EDA получается адъювант, который связывает TLR4 с эффективностью, сравнимой с липополисахаридом, но без сопутствующей токсичности. В сравнении с коротким EDA он вызывает также более высокую продукцию цитокинов NF-κB, TNF-α и IL-12 [104].

На сегодняшний день опубликовано ограниченное количество результатов исследований по использованию EDA в качестве адъюванта. Все они были проведены на животных моделях, при этом данные клинических испытаний на людях в настоящее время не опубликованы. В качестве примеров можно привести работы по слитым белкам, в составе которых EDA связан с неструктурным белком NS3 вируса гепатита С [105] или основным структурным капсидным белком р24 ВИЧ-1 [106]. Известен также продукт слияния N- и С-концов EDA с остатками 1-29 и 43-98 белка E7 папилломавируса-16 и 18 [107]. Во всех трех работах продемонстрирована способность продуктов слияния использованных антигенов с EDA стимулировать клеточный и антительный иммунный ответ.

#### *4.5 Белки теплового шока*

Белки теплового шока (Hsp) – это семейство белков, которые сверхэкспрессируются в ответ на стрессы, вызванные изменениями окружающей среды (например, повышенные

температуры, экстремальные значения рН, осмотический стресс, УФ-облучение, воспаление, недостаток кислорода и питательных веществ) [108]. Hsp являются молекулярными шаперонами. Они принимают участие в поддержании гомеостаза клетки путем предотвращения агрегации белков, оказания им помощи при фолдинге (hsp40, hsp60, hsp70). Они участвуют в перестройке структуры белков с неправильным фолдингом (hsp100) и транспорте белков между клеточными компартментами, а также в протеасомной деградации белков (убиквитин, hsp104) [109]. Функционирование большинства Hsp критически необходимо для выживания клетки, а мутации генов Hsp во многих случаях приводят к летальному исходу. Кроме того, Hsp участвуют в различных сигнальных процессах, включая стимуляцию иммунного ответа через CD14, TLR2 и TLR4 [110].

Одними из первых доказательств того, что Hsp могут быть использованы для стимуляции адаптивного иммунного ответа на комплексные пептидные антигены, стали исследования, показавшие, что введение gp96, выделенного из клеток саркомы мыши, может способствовать отторжению той же опухоли, из которой был очищен gp96. Введение gp96, полученного из нормальных тканей или других опухолей, не проявляло такого эффекта. Впоследствии было установлено, что защитные иммунные реакции вызываются не самим белком gp96, а связанными с ним пептидами самой опухоли [111].

Hsp активируют врожденный и адаптивный иммунитет благодаря своей способности связывать как полипептидные антигены, так и рецепторы антигенпрезентирующих клеток [110]. Способность вызывать гуморальный и клеточный иммунный ответ продемонстрирована при нековалентной загрузке белковых антигенов в пептид-связывающие карманы Hsp и использовании антигенных пептидов, слитых с Hsp [112]. Иммуностимулирующая активность показана для hsp60/hsp65, hsp70, hsp90/gp96 и кальретикулина. При разработке вакцин наиболее интенсивно используется hsp70 [113]. Продемонстрировано, что он обладает мукозальной адьювантной активностью у мышей и людей при доставке интраназально [114] или интравагинально [115] генетически или ковалентно связанных с ним полипептидных антигенов.

Точные механизмы, с помощью которых Hsp стимулируют иммунитет к слитым или нековалентно связанным полипептидным антигенам, до конца не понятны. Однако известно, что Hsp обладают многими свойствами, которые способствуют этой активности. К ним относятся способность выступать в качестве сигнала опасности при высвобождении во внеклеточную среду в ответ на клеточный некроз [116] и взаимодействие с различными рецепторами (CD14, CD40, CD91, LOX-1, SR-A, SREC-1, TLR2 и TLR4), приводящее к стимуляции иммунного ответа и высвобождению цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-12 и хемокинов.

Показана стимуляция созревания дендритных клеток и активация цитотоксических лимфоцитов путем поглощения антигенов, слитых с Hsp [39].

Потенциальной проблемой использования Hsp при разработке субъединичных вакцин является большой размер молекулы, а также необходимость правильного фолдинга Hsp. Это обуславливает необходимость получения белков теплового шока путем очистки из природных источников (например, из опухоли пациента) или получение с помощью методов генетической инженерии, использующих клетки эукариот. Генетическое слияние крупных белковых антигенов из-за их размера может привести к их низкой экспрессии. Чтобы обойти эту проблему и создать слитые иммуногены на основе Hsp были идентифицированы небольшие полипептиды, использование которых позволило создавать упрощенные иммуногенные конструкции с низкой молекулярной массой и сохранением иммуномодулирующей активности [117-119].

Zhang Y. с коллегами недавно разработали оригинальный подход к конструированию иммуногена для противоопухолевой вакцины на основе белка Hsp 110. Действие иммуногена основывается на том, что белок теплового шока Hsp 110 может усиливать противоопухолевый эффект эпитопа, соответствующего 49-57 аминокислотам белка E7 вируса папилломы человека 16 (E7<sub>49-57</sub>). Для доставки иммуногена была использована способность синтетического пептида (ACRGDMFFCA-GGG-KKKKKKKKKKKKKKKKK) формировать положительно заряженные наночастицы, которые связывали отрицательно заряженный плазмидный вектор, кодирующий генетически слитый белок E7<sub>49-57</sub>-Hsp110. Вакцинация лабораторных мышей-носителей опухолевых клеток линии TC-1 показала, что наночастицы, направляемые пептидом ACRGDMFFCA, эффективно проникали в опухолевые клетки и экспрессировали слитый белок E7<sub>49-57</sub>-HSP110. Такой подход позволял подавлять рост опухоли и увеличивал продолжительность выживания мышей как в профилактической, так и терапевтической моделях вакцинации [120].

Вакцины с адъювантами Hsp были исследованы в различных моделях заболеваний животных, включая мышей и приматов, а некоторые прошли клинические испытания на людях. В основном Hsp были использованы для разработки терапевтических противораковых вакцин [120-124]. Также Hsp были применены в качестве адъювантов для вакцин, направленных против вируса простого герпеса-1 (HSV-2) [125], ВИЧ-1 [126], папилломавируса [127] и гриппа [128], возбудителей бактериальных инфекций (*Mycobacteriumleprae* [129] и туберкулеза [130]) и паразитарных (*Schistosomajaponicum* [131]) инфекций.

Кроме того, персонализированная вакцина на основе gp96 (HSPPC-96), известная как Vitespen или Oncophage (Agenus Inc) и основанная на использовании клеток собственной опухоли пациента, была одобрена для лечения неметастатической почечно-клеточной карциномы на ранней стадии в России с 2008 года [132]. Это первая из поступивших на рынок терапевтических вакцин против рака, которая хорошо переносится и не имеет серьезных побочных эффектов. Однако она оказалась малоэффективной на поздних стадиях заболевания. Кроме того, компания Agenus проводит клинические испытания нескольких других вакцин на основе Hsp. К ним относятся проходящие испытания II и III фазы персонализированные вакцины на основе gp96 для лечения глиобластомы [133] и меланомы [134]. Также проводится II фаза испытаний рекомбинантной вакцины на основе hsp70 против генитального герпеса (HerpV; AG-707). Вакцина включает 32 синтетических пептидных антигена простого герпеса-2 [135]. Компания AkelaPharma также провела испытания II фазы вакцины против вируса папилломы человека типа 16. В вакцине в качестве антигена используется сложный иммуноген, состоящий из белка E7 папилломавируса 16, слитого с пептидом *Mycobacteriumbovis* (BCG) и N-концевым фрагментом hsp65 [136]. Было продемонстрировано, что эта вакцина уменьшает количество анальных сквамозных интраэпителиальных поражений, аногенитальных бородавок [137], а также эффективна против рецидивирующего респираторного папилломатоза [138] и цервикальных интраэпителиальных неоплазий [139].

##### 5. Использование слитых белков для конструирования вирусоподобных частиц

Вирусоподобные частицы (ВпЧ) представляют особый интерес для разработки вакцин, поскольку они имитируют размеры и структуру вирусных патогенов. Кроме того, их поверхность может быть декорирована гетерологичными антигенами. Большинство вирусов имеют диаметр около 200 нм. Вакцины на основе ВпЧ, размер которых составляет 10-200 нм, обладают высокой иммуногенностью [140-141]. Хорошими примерами лицензированных вакцин, обладающих иммуногенностью, являются построенные на основе ВпЧ вакцины против вируса папилломы человека [142], а также экспериментальные вакцины на основе ВпЧ против альфавирусов и полиомавирусов [143].

Существенным преимуществом использования ВпЧ в качестве платформы для создания вакцин является возможность формирования гетерологичными белками на их поверхности четвертичных белковых структур. В некоторых случаях наиболее эффективными мишенями для нейтрализующих антител являются не линейные эпитопы белков вирусной поверхности, а конформационные эпитопы, образованные за счет взаимодействия между белковыми мономерами и определяющие целостность самой



частицы. Например, у вируса Денге существуют критически важные перекрестно-реактивные нейтрализующие детерминанты, распознавание которых зависит от целостности димеров белка Е на зрелых, полностью сформированных частицах [144]. Важность нейтрализующих эпитопов, образованных четвертичной конформацией белков, была также продемонстрирована для других вирусов [145-147].

С появлением новых технологий скрининга и обнаружения иммуногенных антигенов-мишеней и достижений в области синтетической биологии стало возможным проектировать функции ВпЧ и разрабатывать вакцины с повышенной иммуногенностью и улучшенной стабильностью [148]. Для этого используют различные пептидные молекулы, обладающие иммуностимулирующими свойствами и позволяющие направлять иммуноген на дендритные клетки или обеспечивающие взаимодействие с эндоплазматическим ретикулюмом. Расположенные внутри или на поверхности ВпЧ иммуностимуляторы способны активировать при вакцинации врожденный иммунный ответ за счет их поглощения клетками иммунной системы вместе с ВпЧ. Такие иммуномодулирующие агенты усиливают иммунный ответ в основном за счет активации экспрессии цитокинов [149].

ВпЧ делятся на две основные группы: оболочечные и безоболочечные. Оболочечные ВпЧ представляют собой самособирающиеся капсиды, которые приобретают липидный слой при отпочковании от клеток-хозяев. В безоболочечных ВпЧ этот слой отсутствует. Примерами безоболочечных ВпЧ, используемых для презентации чужеродных антигенов, являются ВпЧ на основе НВсАг [153], ВпЧ, построенные белком L1 папилломавируса [154], и ВпЧ бактериофага Q $\beta$  [155]. Оболочечные ВпЧ презентуют гетерологичные мембранные белки (т.е. гликопротеины), встроенные в липидную оболочку, покрывающую капсид. Для этого трансмембранные домены в чужеродных белках заменяются трансмембранными доменами белков вируса, на основе которого строится ВпЧ [156]. С помощью такого подхода можно изменить стабильность ВпЧ или ее тропизм. Оболочечные ВпЧ, основанные на использовании ретровирусов и лентивирусов, показали свою перспективность в качестве кандидатов вакцин против таких заболеваний, как грипп, малярия или вирус Денге [157].

Встраивание гетерологичных антигенов в ВпЧ происходит в основном путем генетического слияния или химической конъюгации (рис. 1). Размер вставки имеет значение для сборки ВпЧ и правильной презентации антигена. Небольшие пептидные эпитопы легко встраиваются в структуру ВпЧ, не влияя на самосборку. Наиболее популярным методом в этом случае является генетическое слияние [150]. Химическая конъюгация позволяет встраивать крупные антигены в уже готовые ВпЧ с использованием химических линкеров

или ферментов. В то же время недостатком химической конъюгации является сложность и дороговизна процесса, который требует отдельного получения ВпЧ и антигена, а также проведения химической конъюгации с последующей очисткой от несвязавшихся компонентов [151]. Недавно разработанные технологии позволяют устранять проблемы, связанные с высокой стоимостью и технологической сложностью химической конъюгации. Примером может служить система "Plug and Display", основанная на двух белках: SpyCatcher и SpyTag. Особенностью этих белков является способность к спонтанному ковалентному связыванию при пространственном сближении. Если белок SpyCatcher связан с мономером ВпЧ, а SpyTag - с антигеном, то в результате их объединения образуется двухкомпонентная ВпЧ, готовая к использованию в качестве иммуногена [152].

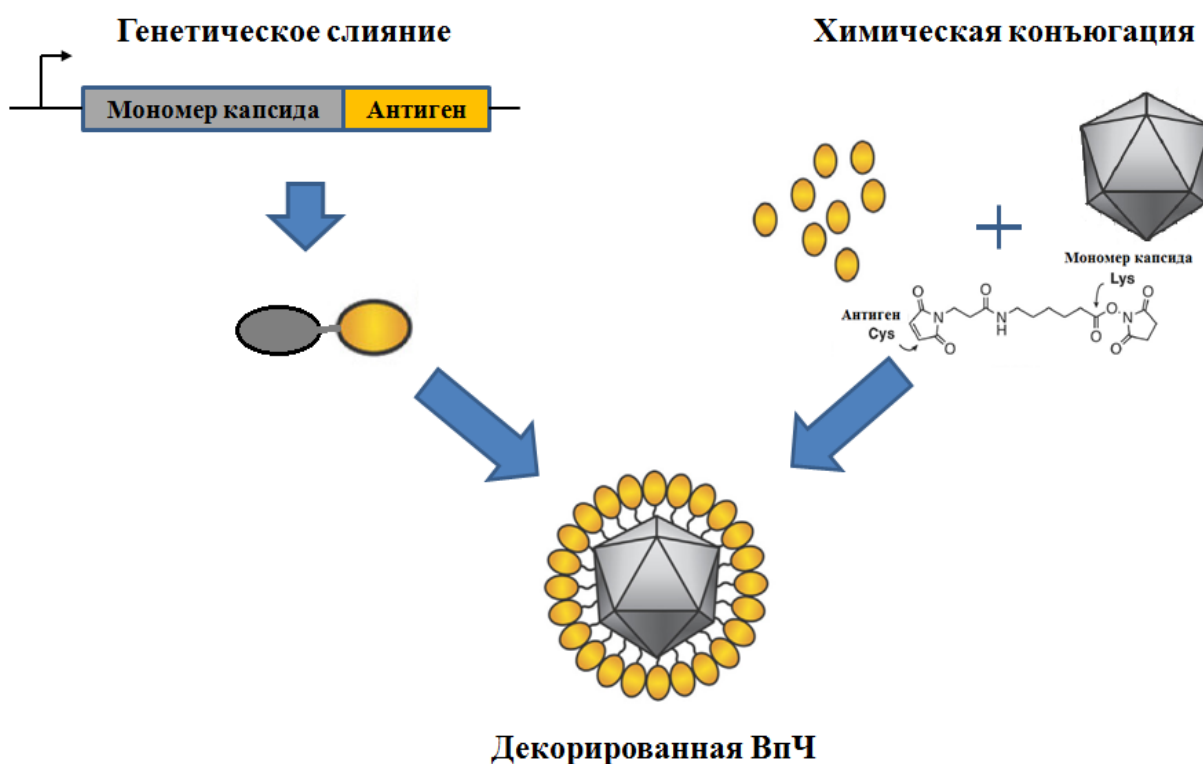


Рисунок 1 – Схема декорирования ВпЧ гетерологичными антигенами

Инженерия ВпЧ долгое время была сложным процессом и часто безуспешным, поскольку вставка даже небольших пептидов может нарушить структуру капсида. К настоящему времени подобраны вирусы, химерные ВпЧ которых используются в фундаментальных и прикладных исследованиях [150]. Успешным примером введения больших пептидов в химерный белок являются ВпЧ, полученные на основе flock house virus. Они были сконструированы таким образом, чтобы выполнять функцию вакцины и нести антитоксин сибирской язвы [158].

Возможность декорирования ВпЧ делает их идеальными кандидатами для разработки вакцинных платформ. Для получения противовирусных вакцин в настоящее

время разрабатывается множество молекулярных платформ (таблица 2). К настоящему времени показано, что слияние вирусных структурных белков для презентации гетерологичных антигенов дает возможность создавать вакцины против вирусов, бактерий, простейших, а также вакцины для терапии и профилактики онкологических заболеваний и различных видов аллергии. Разработка методов получения ВпЧ в простых системах экспрессии создает потенциал для рационализации технологических биопроцессов и предсказуемую биобезопасность. Отработанные технологические процессы в перспективе позволят значительно сократить время для производства вакцин. Учитывая непредсказуемость глобальных вспышек многих инфекционных заболеваний, технологии, использующие химерные ВпЧ в качестве иммуногена для создания вакцин, являются актуальными для решения проблем, связанных с быстрым распространением новых вирусов [159].

Таблица 2 – Платформы на основе вирусоподобных частиц для презентации чужеродных антигенов

Платформа	Мишень	Антиген	Литература
Безоболочечные ВпЧ			
Bacteriophage AP205	HIV-1	HIV-1 gp41 epitopes	[173]
	Influenza	M2e	[174]
	Malaria	Circumsporozoite	[175]
	Malaria	Pfs25 and VAR2CSA proteins	[171]
	Tuberculosis	Ag58A	[172]
	West Nile virus	Domain III of E glycoprotein	[176]
Bacteriophage Q $\beta$	Allergenic	Allergen Der p	[177]
	Allergenic	Allergen Fel d 1	[178]
	Alzheimer's disease	A $\beta$ 1–6 (amyloid peptide)	[179]
	HIV-1	CCR5 coreceptor	[180]
	Hypertension	Angiotensin II	[181]
	Influenza	Hemagglutinin (globular head)	[182]
	Influenza	M2e	[183]
	Nicotine dependence	Nicotine	[184]
	Coronavirus	Universal epitope of the coronavirus	[185]
	Type 2 diabetes	Interleukin-1 $\beta$	[186]

Bovine Papillomavirus	Alzheimer's disease	Amyloid $\beta$ peptide	[187]
	HIV-1	CCR5 peptide	[188]
	HIV-1	V3 loop of HIV-1 gp120	[189]
	HIV-1	HIV-1 gp41 neutralizing epitopes	[190]
	Human papillomavirus (HPV)	HPV 16 L2 neutralizing epitopes	[191]
Cowpea mosaic virus	Canine parvovirus	VP2 capsid protein	[192]
	HIV-1	Glycoprotein 41 peptide	[193]
	Pseudomonas aeruginosa	CPMV-PAE5 peptide	[194]
	Staphylococcus aureus	Truncated D2-domain	[195]
Cucumber mosaic virus	Alzheimer's disease	Amyloid $\beta$ peptides	[196]
	Hepatitis C virus	HCV-derived R9 and R10 mimotopes	[197]
	Newcastle disease virus	Neutralizing epitopes	[198]
Flock House virus	Anthrax	Von Willebrand A domain of ANTXR2 cellular receptor/protective antigen	[159]
	Hepatitis B and hepatitis C virus	Epitopes of hepatitis C virus and hepatitis B surface antigen	[199]
	HIV-1	V3 loop of HIV-1 gp120 protein	[200]
	Influenza	A-helix epitope of HA2	[201]
Hepatitis B core	Anthrax	Domain 4 epitope of the protective antigen (PA) of anthrax toxin	[202]
	Anthrax	2 $\beta$ 2–2 $\beta$ 3 loop of PA	[203]
	Dengue virus	type 2 Envelope domain III	[204]

	Enterovirus 71	SP55 and SP70 epitopes of enterovirus 71	[163]
	Hepatitis C virus (HCV)	B- and T-cell epitopes of HCV	[205]
	Influenza	M2e	[206]
	Lyme disease	OspA and variants of OspC	[207]
	Lyme disease	tHRF, Salp15, and Iric-1	[208]
	Malaria	CSP-specific B and T cell epitopes	[209]
	Tuberculosis	CFP-10	[210]
Human papillomavirus	Human respiratory syncytial virus	Neutralizing epitopes	[161]
	HIV	L1P18 protein	[211]
Murine polyomavirus	Cancer (Breast)	Her2	[212]
	Cancer (Prostate)	Prostate-specific antigen	[213]
	Group A Streptococcus	J8 peptide	[214]
	Influenza	M2e	[215]
	Influenza	Hemagglutinin (globular head)	[216]
	Rotavirus	VP8 antigen	[168]
Tobacco mosaic virus	Foot and mouth disease	Foot and mouth disease peptides	[217]
	Murine hepatitis	Murine hepatitis coronavirus neutralizing epitope	[218]
	Poliovirus	Poliovirus type 3 epitope	[219]
	Pseudomonas aeruginosa	Peptide of outer membrane protein F	[220]
	Rabbit papillomavirus	L2 epitopes	[221]
Norovirus	Rotavirus	VP8 antigen	[170]
	Plasmodium falciparum (malaria parasite)	TSR antigen of circumsporozoite surface protein	[170]

	Hepatitis E virus	Protruding domain antigen	[170]
	Echovirus 30	VP1 antigen	[222]
	Enterovirus type 71	neutralizing epitopes	[223]
	Varicella-zoster virus	neutralizing epitopes	[223]
	Norovirus	neutralizing epitopes of GI.3, GII.3, GII.6, and GII.17 genotypes	[223]
	Cancer	MUC1	[224]
Hepatitis E Virus	Foot-and-mouth disease	E71 neutralizing epitopes	[225]
Porcine circovirus	Porcine circovirus	B-cell epitope	[226]
Triatoma virus	Trypanosoma cruzi	Trypanosoma cruzi proteins (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4)	[227]
Macrobrachium rosenbergi nodavirus	Cancer	GE11 peptide targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR)	[228]
Yeast retrotransposon Ty	Allergenic	Allergen Der p 1 and Asp f 2	[229]
Enterovirus 71	Hand-foot-and-mouth disease	Coxsackievirus A16 peptide	[230]
Оболочечные ВПЧ			
BIV Gag	Influenza	Hemagglutinin (subtypes) and neuraminidase	[231]
HBsAg	Dengue virus	Envelope domain III	[232]
	Hepatitis E Virus	Capsid Epitope	[233]
	Malaria	Circumsporozoite protein	[234]
HIV1-Gag	Dengue virus	Envelope domain III	[235]
	Theileria parva	p67 Antigen	[235]
	Rabies	Fusion rabies glycoprotein (RVG)	[237]
	Influenza	HA and NA	[238]
Influenza M1	Influenza	HA subtypes	[239]
	Influenza	M2	[240]
	Influenza	NA	[241]

	Respiratory syncytial virus	RSV A2 fusion	[242]
Murine leukemia virus Gag	Cancer	Melanoma antigens	[243]
	Human cytomegalovirus	Glycoprotein B	[244]
	Rift Valley fever virus	Glycoproteins GN, GC, and nucleoprotein N	[245]
	Influenza	HA and NA	[246]

Безоболочечные ВпЧ структурно менее сложны, чем их оболочечные аналоги, и могут нарабатываться как в простых прокариотических (*E. coli*), так и в эукариотических системах (дрожжи). Это делает их легко масштабируемыми, экономически эффективными и быстрыми в производстве. Наличие липидного бислоя в оболочечных ВпЧ обуславливает необходимость использования клеток высших эукариот для экспрессии структурных компонентов ВпЧ, что увеличивает общее время и стоимость производства. Тем не менее, оболочечные ВпЧ имеют то преимущество, что позволяют представлять иммунной системе антигены, ассоциированные с липидной мембраной.

Высокая иммуногенность является свойством вакцины, во многом определяющим ее эффективность. Для повышения иммуногенности, включенные в состав ВпЧ антигены должны быть расположены стерически правильно, чтобы максимизировать их презентацию иммунной системе. С этой целью часто применяется слияние антигенных пептидов с N- или C-концами вирусных белков, формирующих ВпЧ [160]. Представлены работы, в которых пептидные эпитопы включены в полипептидную цепь экспонированных на поверхности ВпЧ петель белков, формирующих ВпЧ. Встроенные таким образом пептиды выступают на поверхности ВпЧ, что делает их более доступными для иммунной системы. Примерами таких вакцинных платформ являются ВпЧ на основе НВсAg, папилломавируса (бычьего и человеческого), flock house virus и других вирусов [154, 161-162].

Так, ВпЧ на основе НВсAg оказались отличной платформой для презентации эпитопов благодаря их способности эффективно взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками, отображать гетерологичные эпитопы с высокой плотностью и оказывать помощь Т-клеткам. Коровый антиген вируса гепатита В, экспрессируемый в рекомбинантных системах, может самособирается в ВпЧ с симметрией T=3 или T=4. ВпЧ чрезвычайно иммуногенны и успешно применены для максимизации иммуногенного и защитного потенциала высококонсервативных эпитопов SP55 и SP70

разных субгенотипов вируса EV71. Получение таких химерных ВпЧ показало возможность разработки универсальной вакцины против EV71 на основе ВпЧ и пептидов [162].

Заметим, что получили вирусоподобную частицу EV71 (EV71-VLP) и ее химеры с использованием рекомбинантного бакуловируса (Vac-P1-3CD), коэкспрессирующего белки EV71 P1 (под промотором полиэдрина) и 3CD (под промотором CMV-IE) в клетках Sf9. Химера EV71-VLP ChiEV71(1E)-VLP или ChiEV71(4E)-VLP несет один эпитоп CA16 PEP71 в VP1 или четыре консервативных эпитопа, нейтрализующих CA16 путем замещения соответствующих участков структурных белков EV71. У мышей EV71-VLP и его химеры вызывали наработку EV71-специфических титров IgG и нейтрализующих антител. Вакцинация ChiEV71(1E)-VLP или ChiEV71(4E)-VLP привела к значительной продукции CA16-специфических нейтрализующих антител и к перекрестной защите от инфекции CA16 [230].

Использование коротких пептидов, имеющих относительно простую структуру, не представляет особых проблем для встраивания в выступающие петли белка-носителя. Однако пептиды с более сложной структурой, требуют использования других платформ [163]. На примере HBsAg было показано, что гетеролочные антигены, введенные в иммунодоминантные петли платформы HBsAg, способны нарушать целостность ВпЧ. Это накладывает значительные ограничения на выбор антигена. Для таких сложных антигенов была разработана система SplitCore, в которой белок HBsAg разделен на две части в пределах иммунодоминантной петли. Коэкспрессия обеих частей обеспечивает образование ВпЧ. Слияние антигена с концом одного из фрагментов приводит к экспонированию на поверхности ВпЧ различных антигенов [164].

Презентация целых белковых доменов на поверхности ВпЧ позволяет представить иммунной системе несколько антигенных эпитопов и, в дополнение, повышает вероятность того, что эпитопы примут свою нативную конформацию. Тем не менее, большой размер белковых доменов может вызывать стерические помехи, что приводит к нарушению сборки ВпЧ [165]. Для устранения этого недостатка было разработано несколько подходов к специфической презентации крупных антигенов. Одним из них явилось использование длинных гибких богатых глицином линкеров, обеспечивающих пространственное разделение доменов [166]. Несмотря на эффективность такого подхода, оптимальная длина линкера для различных антигенов определяется эмпирически. В некоторых случаях стерические помехи устраняют путем уменьшения содержания антигена на поверхности ВпЧ. Для этого самосборку ВпЧ проводят в присутствии как слитого, так и немодифицированного белков [167-168]. Хотя такие методы могут привести к успешной сборке ВпЧ, тем не менее, увеличение размера антигена может вызвать снижение



иммуногенности за счет уменьшения его количества. Например, подобный эффект наблюдался уполученной на основе ВпЧ вакцины против малярии [169].

Сообщалось об использовании новых ВпЧ-платформ для презентации крупных антигенов на основе белка L1 папилломавируса и одного из белков фага *Acinetobacter* (AP205) [171-172]. Для презентации крупных белков большие перспективы имеют платформы AviTag и SpyTag/SpyCatcher, позволяющие конъюгировать антигены с ВпЧ после их сборки с помощью реакции биотин-стрептавидин (AviTag) или спонтанного образования необратимой изопептидной связи (SpyTag/SpyCatcher). С помощью таких подходов создается возможность проведения скрининга большого количества вакцин-кандидатов. Кроме того, возможно использование ВпЧ и антигенов, полученных в разных системах экспрессии, что представляет особый интерес, если посттрансляционные модификации белков имеют решающее значение для иммуногенности [152].

Одним из успешных подходов для формирования ВпЧ, декорированных чужеродными антигенами, явилось использование VP1 норовируса, который состоит из двух доменов: наружного (P) и внутреннего (S). Эти домены соединены между собой естественным линкером – шарнирным регионом. Каждый из этих доменов способен самостоятельно формировать ВпЧ. С использованием S домена оболочки норовируса, который естественным образом формирует внутреннюю оболочку капсида, была разработана технология получения 60-валентных икосаэдрических наночастиц с помощью системы экспрессии в *E. coli*. Такая поливалентная наночастица с 60 открытыми шарнирными регионами С-концевой области домена S представляет собой удобную платформу для презентации гетерологичных антигенов на поверхности ВпЧ [170].

Подтверждением явилось получение в Нижегородском НИИЭМ им. И.Н. Блохиной ВпЧ, построенных из химерных белков VP1 норовируса и E1 белка энтеровируса ЕСНО-30. Имеющиеся в настоящее время и подготавливаемые к публикации данные свидетельствуют, что норовирусная основа использованной платформы обладает адьювантным действием, усиливающим созревание и активацию дендритных клеток в условиях *in vitro*. В то же время с помощью электронной микроскопии показано, что химерные белки самопроизвольно формирует *in vitro* полые вирусоподобные частицы диаметром примерно 50 нм. Полученные рекомбинантные ВпЧ содержат на своей поверхности белок E1 варианта вируса E30, циркулирующего на территории России, и могут быть использованы для профилактики серозного менингита и других заболеваний, вызванных энтеровирусом E30 [222].

## Заключение

События последних лет продемонстрировали, насколько важным является постоянное совершенствование вакцин и технологий их получения. Новые технологии конструирования вакцин позволили быстро обеспечить здравоохранение достаточно эффективными вакцинами для профилактики новой коронавирусной инфекции. Вместе с тем продолжается поиск новых молекулярных платформ для профилактики инфекционных заболеваний как бактериальной, так и вирусной природы. Разрабатываются разнообразные подходы к созданию инновационных вакцин на основе слитых белков, получаемых с помощью генно-инженерного и химического синтеза. Важным направлением поиска служит применение слитых белков, обладающих как антигенными, так и адьювантными свойствами, что является одним из решений вопроса о менее высокой эффективности субъединичных вакцин. Достаточно успешно развиваются исследования по конструированию вакцин на основе вирусоподобных частиц, построенных из химерных белков. Получение таких молекулярных конструкций перспективно для создания новых типов противовирусных вакцин.

## Список литературы

1. Pollard A.J., Bijker E.M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments // *Nat. Rev. Immunol.* - 2021. - Vol. 23. - P.83–100. doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7.
2. Moyer T.J., Zmolek A.C., Irvine D.J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines // *J. Clin. Invest.* - 2016. - Vol. 126 - P. 799–808. doi.org/10.1172/JCI81083.
3. De Gregorio E., Rappuoli R. From empiricism to rational design: A personal perspective of the evolution of vaccine development // *Nat. Rev. Immunol.* -2014. Vol.14. - P. 505–514. doi.org/10.1038/nri3694.
4. Mak T.W., Saunders M.E. B.D.B.T.-P. to the I.R. // in: Second Jett E. (Eds.), Chapter14 - Vaccination. -in: Academic Cell, Boston. - 2014. - P. 333–375. doi.10.1016/B978-0-12-385245-8.00014-5.
5. Capecchi B., Serruto D., Adu-Bobie J. et al. The genome revolution in vaccine research // *Curr. Issues Mol. Biol.* - 2004. - Vol. 6. doi.org/10.21775/cimb.006.017.
6. Afrough B., Dowall S., Hewson R. Emerging viruses and current strategies for vaccine intervention // *Clin. Exp. Immunol.* - 2019. - Vol. 196 -P. 157–166. doi.org/10.1111/cei.13295.
7. Tannock G.A., Kim H., Xue L. Why are vaccines against many human viral diseases still unavailable; an historic perspective? // *J Med. Virol.* - 2020. -Vol. 92, Suppl. 2. - P. 129–138. doi.org/10.1002/jmv.25593.
8. Rinaudo C.D., Telford J.L., Rappuoli R. et al. Vaccinology in the genome era // *J. Clin. Invest.* - 2009. Vol.119, Suppl. 9. - P. 2515–2525. doi.org/10.1172/JCI38330.
9. Dormitzer P.R., Ulmer J.B., Rappuoli R. Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines // *Trends Biotechnol.* - 2008. -Vol. 26. - P. 659–667. doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.08.002.
10. Anasir M.I., Poh C.L. Structural vaccinology for viral vaccine design // *Front. Microbiol.* - 2019. - Vol. 10. - P. 738. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00738.
11. Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges // *Virology.* - 2015. - Vol. 479–480. - P. 379–392. doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032.
12. Bhardwaj S., in: D. VohoraG.B.T.-P.M., T.C.R. - Singh (Eds.), Chapter 21. -Vaccines, Academic Press, Boston. - 2018. - P. 341–353. doi.10.1016/B978-0-12-802103-3.00022-5.
13. Donati C., Rappuoli R. Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* -2013. - Vol. 1285. - P. 115–132.
14. Jones L.H. Recent advances in the molecular design of synthetic vaccines // *Nat. Chem.* 2015. 7 (12), 952–960.

15. Cunningham M.W. Post-streptococcal autoimmune sequelae: rheumatic fever and beyond. In: Ferretti J.J., Stevens D.L., Fischetti V.A. (Eds.). *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*// 2016. - University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK
16. Brito L.A., Malyala P., O'Hagan D.T. Vaccine adjuvant formulations: a pharmaceutical perspective // *Semin. Immunol.* - 2013. - Vol. 25, Suppl. 2. - P. 130–145
17. Becher P., Orlich M., Thiel H.J. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: Generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease // *J. Virol.* - 2001. - Vol. 75, Suppl. 14. - P. 6256–6264.
18. Moyle P.M., Toth I. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities // *Chem. Med. Chem.* -2013. - Vol. 8, Suppl. 3. - P. 360–376.
19. Berti F., Adamo R., Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives // *ACS Chem. Biol.* - 2013. - Vol. 8, Suppl. 8. -P. 1653–1663.
20. Luo Y., Friese O.V., Runnels H.A.et al. The dual role of lipids of the lipoproteins in Trumenba, a self-adjuvanting vaccine against Meningococcal meningitis B disease // *AAPS J.* - 2016. - Vol. 18, Suppl. 6. -P. 1562–1575.
21. Moyle P.M., Dai W., Liu T.Y.et al. Combined synthetic and recombinant techniques for the development of lipoprotein-based, self-adjuvanting vaccines targeting human papillomavirus type-16 associated tumors // *Bioorg. Med. Chem.* - 2015. - Vol. 25, Suppl. 23. - P. 5570–5575.
22. Foged C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems // *Ther. Deliv.* - 2011. - Vol. 2, Suppl. 8. - P. 1057–1077.
23. Brito L.A., Malyala P., O'Hagan D.T. Vaccine adjuvant formulations: a pharmaceutical perspective // *Semin. Immunol.* - 2013. - Vol. 25, Suppl. 2. -P. 130–145.
24. Grandi G., Nagy E. Finding protective bacterial antigens. In: von Gabain A., Klade C. (Eds.), *Development of Novel Vaccines.* - 2012. - Springer, New York, P. 27–44.
25. Seo H., Duan Q., Zhang W. Vaccines against gastroenteritis, current progress and challenges // *Gut Microbes.* -2020. - Vol. 11, Suppl. 6. - P. 1486–1517.
26. Savelkoul H.F., Ferro V.A., Strioga M.M.et al. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines // *Vaccines (Basel).* -2015. - Vol. 3, Suppl. 1. - P. 148–171.
27. Lee S., Nguyen M.T. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases // *Immune Netw.* - 2015. - Vol. 15, Suppl. 2. - P. 51–57.
28. Bates J.T., Graff A.H., Phipps J.P.et al. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell response independently of TLR5 and MyD88 // *J. Immunol.* - 2011. - Vol. 186, Suppl. 11. - P. 6255–6262.

29. Garaude J., Kent A., van Rooijen N. et al. Simultaneous targeting of Toll-like receptors induces effective tumor-specific immune responses // *Sci. Transl. Med.* - 2012. - Vol. 4, Suppl. 120. - P. 116–120.
30. Huang Q., Yu W., Hu T. Potent antigen-adjuvant delivery system by conjugation of Mycobacterium tuberculosis Ag85B-HspX fusion protein with arabinogalactan-poly(I: C) conjugate // *Bioconjug. Chem.* - 2016. - Vol. 27, Suppl. 4. - P. 1165–1174.
31. Huleatt J.W., Jacobs A.R., Tang J. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity // *Vaccine.* - 2007. - Vol. 25, Suppl. 4. - P. 763–775.
32. Kreutz M., Giquel B., Hu Q. et al. Antibody-antigen-adjuvant conjugates enable co-delivery of antigen and adjuvant to dendritic cells in cis but only have partial targeting specificity // *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7, Suppl. 7. - e40208.
33. Zomet G.G., Khan S., Filippov D.V. et al. TLR ligand-peptide conjugate vaccines: toward clinical application // *Adv. Immunol.* - 2012. - Vol. 114. - P. 177–201.
34. Kastenmuller W., Kastenmuller K., Kurts C. et al. Dendritic cell-targeted vaccines - hope or hype? // *Nat. Rev. Immunol.* - 2014. - Vol. 14, Suppl. 10. - P. 705–711
35. Blander J.M., Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors // *Science.* - 2004. - Vol. 304, Suppl. 5673. - P. 1014–1018.
36. Wille-Reece U., Wu C.Y., Flynn B.J. et al. Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses // *J. Immunol.* - 2005. - Vol. 174, Suppl. 12. - P. 7676–7683.
37. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential // *J. Immunol.* - 2010. - Vol. 185, Suppl. 10. - P. 5677–5682.
38. Knudsen N.P., Olsen A., Buonsanti C. et al. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6, Suppl. 19. - P. 570.
39. Moyle P. M. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines // *Biotechnol. Adv.* - 2017. - Vol. 35. - P. 375–389.
40. De Groot A.S., Moise L., Terry F. et al. Better epitope discovery, precision immune engineering, and accelerated vaccine design using immunoinformatics tools // *Front Immunol.* - 2020. - Vol. 11, Suppl. 442. doi: 10.3389/fimmu.2020.00442.
41. Чикаев А.Н., Щербакова Н.С., Карпенко Л.И. и др. Разработка искусственных полиэпитопных В-клеточных иммуногенов в качестве вакцин против ВИЧ-1 // *Бюллетень ВСНЦ СЦ РАМН.* - 2011. - Т. 3, вып. 79. - С. 229-232

42. Luo J.,Huo C.,Qin H.et al.Chimeric enterovirus 71 virus-like particle displaying conserved coxsackievirus A16 epitopes elicits potent immune responses and protects mice against lethal EV71 and CA16 infection // *Vaccine* . 2021. - Vol. 39, Suppl. 30. - P. 4135-4143.doi: 10.1016/j.vaccine.2021.05.093.
43. Yassine H.M., Boyington J.C., McTamney P.M. et al. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection // *Nat Med*. -2015. - Vol. 21. - P. 1065–1070.
44. Georgiev I.S., Joyce M.G., Chen R.E. et al. Two-component ferritin nanoparticles for multimerization of diverse trimeric antigens // *ACS Infect. Dis.*- 2018. - Vol. 4. - P. 788–796.
45. Burkhard P., Lanar D.E. Malaria vaccine based on self-assembling protein nanoparticles // *Expert Rev. Vaccines*. -2015. - Vol. 14. -P. 1525–1527.
46. King N.P., Sheffler W., Sawaya M.R. et al. Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy // *Science*. - 2012.- Vol. 336. -P. 1171–1174.
47. King N.P., Bale J.B., Sheffler W. et al. Accurate design of co-assembling multi-component protein nanomaterials // *Nature*. -2014. - Vol. 510. - P. 103–108.
48. Rodrigues M.Q., Alves P.M., Roldão A. Functionalizing ferritin nanoparticles for vaccine development // *Pharmaceutics*. - 2021. - Vol. 13, Suppl. 10. - P. 1621.
49. Munro H.N., Linder M.C. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism // *Physiol. Rev*. - 1978. - Vol. 58. - P. 317–396.
50. Bhaskar S., Lim S. Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications // *NPG Asia Mater*. - 2017. - Vol. 9. - e371.
51. Pantopoulos K., Porwal S.K., Tartakof A. et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis // *Biochemistry*. -2012. - Vol. 51. - P. 5705–5724.
52. Li C.Q., Soistman E., Carter D.C. Ferritin nanoparticle technology. A new platform for antigen presentation and vaccine development // *Ind. Biotechnol*. - 2006. -Vol. 2. - P. 143–147
53. Khoshnejad M., Parhiz H., Shuvaev V.V.et al. Ferritin-based drug delivery systems: Hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting // *J. Control. Release*. -2018. - Vol. 282. - P. 13–24.
54. Wang W., Liu Z., Zhou X. et al. Ferritin nanoparticle-based SpyTag/SpyCatcher-enabled click vaccine for tumor immunotherapy // *Nanomedicine*. - 2019. - Vol. 16. - P. 69-78.
55. Rodrigues M.Q. Alves P.M.; Roldão A. Functionalizing ferritin nanoparticles for vaccine development // *Pharmaceutics*.- 2021. -Vol. 13. - P. 1621-1646. doi.org/10.3390/pharmaceutics13101621
56. Joyce M.G., King H.A.D., Elakhal-Naouar I. et al. A SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine elicits protective immune responses in nonhuman primates // *Sci Transl Med*. - 2022. - Vol. 14, Suppl. 632. eabi5735.

57. Uchida M., Kang S., Reichhardt C. et al. The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.* - 2010. - Vol. 1800. - P. 834–845.
58. He D.; Marles-Wright J. Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology // *New Biotechnol.* - 2015. - Vol. 32. - P. 651–657.
59. Wang Z., Xu L., Yu H. et al. Ferritin nanocage-based antigen delivery nanoplatfoms: Epitope engineering for peptide vaccine design // *Biomater. Sci.* - 2019. - Vol. 7. -P. 1794–1800.
60. Chiou B., Connor J.R. Emerging and dynamic biomedical uses of ferritin // *Pharmaceuticals* - 2018. - Vol 11. - P. 124.
61. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria // *Trends Microbiol.* - 2014. - Vol. 22, Suppl. 9. - P. 517–527.
62. Wang Q., Suzuki A., Mariconda S. et al. Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum // *EMBO J.* - 2005a. - Vol. 24, Suppl. 11. - P. 2034–2042.
63. Chaban B., Hughes H.V., Beeby M. The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2015. - Vol. 46. - P. 91–103.
64. Altegoer F., Schuhmacher J., Pausch P. et al. From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: a lesson by the bacterial flagellum // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* - 2014. - Vol. 30, Suppl. 1–2. - P. 49–64.
65. Andersen-Nissen E., Smith K.D., Strobe K.L. et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria // *PNAS of the USA.* - 2005. - Vol. 102, Suppl. 26. - P. 9247–9252.
66. Khim K., Bang Y.J., Puth S. et al. Deimmunization of flagellin for repeated administration as a vaccine adjuvant // *NPJ Vaccines.* - 2021. - Vol. 6, Suppl. 1. - P. 116.doi: 10.1038/s41541-021-00379-4.
67. Franchi L., Amer A., Body-Malapel M. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages // *Nat. Immunol.* - 2006. - Vol. 7, Suppl. 6. - P. 576–582.
68. Garaude J., Kent A., van Rooijen N. et al. Simultaneous targeting of Toll and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses // *Sci. Transl. Med.* - 2012. - Vol. 4, Suppl. 120. - P. 116–120.
69. Yoon S.I., Kurnasov O., Natarajan V. et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling // *Science.* -2012. - Vol. 335, Suppl. 6070. - P. 859–864.
70. Murthy K.G., Deb A., Goonesekera S. et al. Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro // *J. Biol. Chem.* - 2004. - Vol. 279, Suppl. 7. - P. 5667–5675.

71. Lightfield K.L., Persson J., Brubaker S.W. et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin // *Nat. Immunol.* - 2008. - Vol. 9, Suppl. 10. - P. 1171–1178.
72. Zhao Y., Li Z., Voyer J. et al. Virus-like particle hybrid platform with high immunogenicity, safety, and versatility for vaccine development // *ACS Appl Mater Interfaces.* - 2022. doi: 10.1021/acsami.2c01028.
73. Lu Y., Swartz J.R. Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6, Suppl. 18. - P. 379.
74. Delavari S., Sohrabi M., Ardestani M.S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adjuvant: superiority of a conjugated form of flagellin versus a mixture with a human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidate in the induction of immune responses // *J. Med. Microbiol.* - 2015. - Vol. 64, Suppl. 11. -P. 1361–1368.
75. Lin K.H., Chang L.S., Tian C.Y. et al. Carboxyl-terminal fusion of E7 into flagellin shifts TLR5 activation to NLRC4/NAIP5 activation and induces TLR5-independent anti-tumor immunity // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6, Suppl. 24. - P. 199.
76. Lu Y., Welsh J.P., Chan W. et al. *Escherichia coli*-based cell free production of flagellin and ordered flagellin display on virus-like particles // *Biotechnol. Bioeng.* - 2013. - Vol. 110, Suppl. 8. - P. 2073–2085.
77. Lu Y., Swartz J.R. Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6. - Suppl. 18. - P. 379.
78. Burdelya L.G., Krivokrysenko V.I., Tallant T.C. et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models // *Science.* -2008. - Vol. 320, Suppl. 5873. - P. 226–230.
79. Faham A., Altin J.G. Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that can induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect // *J. Immunol.* - 2010. - Vol. 185, Suppl. 3. - P. 1744–1754.
80. Lee L.H., Burg E., Baqar S. et al. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni* // *Infect. Immun.* - 1999. - Vol. 67, Suppl. 11. -P. 5799–5805.
81. Tussey L., Strout C., Davis M. et al. Phase 1 safety and immunogenicity study of a quadrivalent seasonal flu vaccine comprising recombinant hemagglutinin-flagellin fusion proteins // *Open Forum. Infect. Dis.* - 2016. - Vol. 3, Suppl. 1. - ofw015.
82. Côté-Cyr M., Zottig X., Gauthier L. et al. Self-assembly of flagellin into immunostimulatory ring-like nanostructures as an antigen delivery system // *ACS Biomater Sci Eng.* - 2022. - Vol. 8, Suppl. 2. - P. 694-707.



83. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А. и др. Изучение иммуногенности гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2015. - № 2, вып. 81, - С.96-101.
84. Frey S.E., Lottenbach K., Graham I. et al. A phase I safety and immunogenicity dose escalation trial of plague vaccine, flagellin/F1/V, in healthy adult volunteers (DMID 08-0066) // Open Forum. Infect. - 2015. - Dis. 2 (Suppl. 1). - S235.
85. Desheva Y., Leontieva G., Kramskaya T. et al. Associated virus-bacterial vaccine based on seasonal LAIV and *S. pneumoniae* chimeric peptide provide protection against post-influenza pneumococcal infection in mouse model // Virulence. - 2022. - Vol. 13, Suppl. 1. - P. 558-568.
86. Chassaing B., Ley R.E., Gewirtz A.T. Intestinal epithelial cell toll-like receptor 5 regulates the intestinal microbiota to prevent low-grade inflammation and metabolic syndrome in mice // Gastroenterology. - 2014. - Vol. 147, Suppl. 6. - P. 1363–1377.
87. Cullender T.C., Chassaing B., Janson A. et al. Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut // Cell Host Microbe. - 2013. - Vol. 14, Suppl. 5. - P. 571–581.
88. Xiao Y., Liu F., Yang J. et al. Over-activation of TLR5 signaling by high-dose flagellin induces liver injury in mice // Cell. Mol. Immunol. - 2015. - Vol. 12, Suppl. 6. - P. 729–742.
89. Blohmke C.J., Victor R.E., Hirschfeld A.F. et al. Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease // J. Immunol. - 2008. - Vol. 180, Suppl. 11. - P. 7764–7773.
90. Vogeley L., El Arnaout T., Bailey J. et al. Structural basis of lipoprotein signal peptidase II action and inhibition by the antibiotic globomycin // Science. - 2016. - Vol. 351, Suppl. 6275. - P. 876–880.
91. Nakayama H., Kurokawa K., Lee B.L. Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways // FEBS J. - 2012. - Vol. 279, Suppl. 23. - P. 4247–4268.
92. Aliprantis A.O., Yang R.B., Mark M.R. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2 // Science. - 1999. - Vol. 285, Suppl. 5428. - P. 736–739.
93. Leng C.H., Liu S.J., Chen H.W. et al. Recombinant bacterial lipoproteins as vaccine candidates // Expert Rev. Vaccines. - 2015. - Vol. 14, Suppl. 12. - P. 1623–1632.
94. Huang C.Y., Chen J.J., Shen K.Y. et al. Recombinant lipidated HPV E7 induces a Th-1-biased immune response and protective immunity against cervical cancer in a mouse model // PLoS One. - 2012. - Vol. 7, Suppl. 7. - e40970.

95. Halliday A., Turner J.D., Guimaraes A. et al. The TLR2/6 ligand PAM2CSK4 is a Th2 polarizing adjuvant in *Leishmania major* and *Brugia malayi* murine vaccine models // *Parasit. Vectors.*- 2016. - Vol. 9. - P. 96.
96. Nyirenda M.H., Morandi E., Vinkemeier U. et al. TLR2 stimulation regulates the balance between regulatory T cell and Th17 function: a novel mechanism of reduced regulatory T cell function in multiple sclerosis // *J. Immunol.* - 2015. - Vol. 194,Suppl. 12. - P. 5761–5774.
97. Leng C.H., Liu S.J., Chen H.W. et al. Recombinant bacterial lipoproteins as vaccine candidates // *Expert Rev. Vaccines.* -2015. - Vol. 14, Suppl. 12. - P. 1623–1632.
98. Basto A.P., Piedade J., Ramalho R. et al. A new cloning system based on the OprI lipoprotein for the production of recombinant bacterial cell wall-derived immunogenic formulations // *J. Biotechnol.* - 2012. - Vol. 157, Suppl. 1. - P. 50–63.
99. Zollinger A.J., Smith M.L. Fibronectin, the extracellular glue // *Matrix Biol.* - 2016. doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.011.
100. White E.S., Muro A.F. Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models // *IUBMB Life.* -2011. - Vol. 63,Suppl. 7. - P. 538–546.
101. Lasarte J.J., Casares N., Gorraiz M. et al. The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo // *J. Immunol.* - 2007. - Vol. 178,Suppl. 2. - P. 748–756.
102. Arribillaga L., Durantez M., Lozano T. et al. A fusion protein between streptavidin and the endogenous TLR4 ligand EDA targets biotinylated antigens to dendritic cells and induces T cell responses in vivo // *Biomed. Res. Int.* -2013. - ID 864720.
103. Julier Z., de Titta A., Grimm A.J. et al. Fibronectin EDA and CpG synergize to enhance antigen-specific Th1 and cytotoxic responses // *Vaccine.* -2016. - Vol. 34,Suppl. 21/ - P. 2453–2459.
104. Julier Z., Martino M.M., de Titta A. et al. The TLR4 agonist fibronectin extra domain A is cryptic, exposed by elastase-2; use in a fibrin matrix cancer vaccine // *Sci. Rep.* - 2015. - Vol. 5. - P. 8569.
105. Mansilla C., Gorraiz M., Martinez M. et al. Immunization against hepatitis C virus with a fusion protein containing the extra domain A from fibronectin and the hepatitis C virus NS3 protein // *J. Hepatol.* - 2009. - Vol. 51,Suppl. 3. - P. 520–527.
106. San Roman B., De Andres X., Munoz P.M. et al. The extradomain A of fibronectin (EDA) combined with poly(I:C) enhances the immune response to HIV-1 p24 protein and the protection against recombinant *Listeria monocytogenes*-Gag infection in the mouse model // *Vaccine.* -2012. - Vol. 30, Suppl. 15. - P. 2564–2569.

107. Arribillaga L., Echeverria I., Belsue V. et al. Bivalent therapeutic vaccine against HPV16/18 genotypes consisting of a fusion protein between the extra domain A from human fibronectin and HPV16/18 E7 viral antigens // *Cancer*. - 2020. - Vol. 8. Suppl. 1. - e000704.
108. Colaco C.A., Bailey C.R., Walker K.B. et al. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity // *Biomed. Res. Int.* - 2013. - Vol. 461. - P. 230.
109. Verghese J., Abrams J., Wang Y. et al. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2012. - vol. 76, Suppl. 2. - P. 115–158.
110. Colaco C.A., Bailey C.R., Walker K.B. et al. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity // *Biomed. Res. Int.* - 2013. - Vol. 461. - P. 230.
111. Demine R., Walden P. Testing the role of gp96 as peptide chaperone in antigen processing // *J. Biol. Chem.* -2005. - Vol. 280, Suppl. 18. - Vol. 17. - P. 573–578.
112. Wald A., Koelle D.M., Fife K. et al. Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons // *Vaccine*. -2011. - Vol. 29, Suppl. 47. - P. 8520–8529.
113. McNulty S., Colaco C.A., Blandford L.E. et al. Heatshock proteins as dendritic cell-targeting vaccines—getting warmer // *Immunology*. -2013. - Vol. 139, Suppl. 4. - P. 407–415.
114. Pack C.D., Gierynska M., Rouse B.T. An intranasal heat shock protein based vaccination strategy confers protection against mucosal challenge with herpes simplex virus // *Hum. Vaccin.* - 2008. - Vol. 4, Suppl. 5. - P. 360–364.
115. Lewis D.J., Wang Y., Huo Z. et al. Effect of vaginal immunization with HIVgp140 and HSP70 on HIV-1 replication and innate and T cell adaptive immunity in women // *J. Virol.* - 2014. - Vol. 88, Suppl. 20. - Vol. 11. - P. 648–657.
116. Davies E.L., Bacelar M.M., Marshall M.J. et al. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL // *Clin. Exp. Immunol.* - 2006. - Vol. 145, Suppl. 1. -P. 183–189.
117. Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Aksenov N.D. et al. The discovery of Hsp70 domain with cell-penetrating activity // *Cell Stress Chaperones*. -2015. - Vol. 20, Suppl. 2. - P. 343–354.
118. Zhou C.M., Zhang G.X., Ma X.X. Characterization and evaluation of the immune responses elicited by a novel human papillomavirus (HPV) therapeutic vaccine: HPV 16E7-HBcAg-Hsp65 fusion protein // *J. Virol. Methods*. -2014. - Vol. 197. - P. 1–6.
119. Zhuravleva A., Gierasch L.M. Substrate-binding domain conformational dynamics mediate Hsp70 allostery // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2015. - Vol. 112, Suppl. 22. - E2865–E2873.

120. Zhang Y., Ren F., Ni B. et al. Tumor targeting nanoparticle E7<sub>49-57</sub>-HSP110-RGD elicits potent anti-tumor immune response in a CD8-dependent manner in cervical cancer-bearing mouse model // *Hum Vaccin Immunother.* - 2021. - Vol. 17, Suppl. 10. - P. 3529-3538.
121. Ampie L., Choy W., Lamano J.B. et al. Heat shock protein vaccines against glioblastoma: from bench to bedside // *J. Neuro-Oncol.* - 2015. - Vol. 123, Suppl. 3. - P. 441–448.
122. Brauns T., Leblanc P., Gelfand J.A. et al. Could mycobacterial Hsp70-containing fusion protein lead the way to an affordable therapeutic cancer vaccine? // *Expert Rev Vaccines.* - 2015. - Vol. 14, Suppl. 3. -P. 435–446.
123. Shevtsov M., Multhoff G. Heat shock protein-peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer // *Front. Immunol.* - 2016. - Vol. 7. - P. 171.
124. Wach M.M., Subjeck J.R., Wang X.Y. et al. Recombinant human Hsp110-gp100 chaperone complex vaccine is nontoxic and induces response in advanced stage melanoma patients//*Melanoma Res.* - 2022. - Vol. 32, Suppl. 2. - P. 88-97.
125. Wald A., Koelle D.M., Fife K. et al. Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons // *Vaccine.* -2011. - Vol. 29, Suppl. 47. - P. 8520–8529.
126. Krupka M., Zachova K., Cahlikova R. et al. Endotoxin-minimized HIV-1 p24 fused to murine hsp70 activates dendritic cells, facilitates endocytosis and p24-specific Th1 response in mice // *Immunol. Lett.* - 2015. - Vol. 166, Suppl. 1. - P. 36–44.
127. Zhou C.M., Zhang G.X., Ma X.X. Characterization and evaluation of the immune responses elicited by a novel human papillomavirus (HPV) therapeutic vaccine: HPV 16E7-HBcAg-Hsp65 fusion protein // *J. Virol. Methods.* -2014. - Vol. 197. -P. 1–6.
128. Yang P., Wang W., Gu H. et al. Protection against influenza H7N9 virus challenge with a recombinant NPM1- HSP60 protein vaccine construct in BALB/c mice // *Antivir. Res.* - 2014. - Vol. 111. - P. 1–7.
129. Mukai T., Maeda Y., Tamura T. et al. Induction of cross-priming of naive CD8+ T lymphocytes by recombinant bacillus Calmette- Guerin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein // *J. Immunol.* - 2009. - Vol. 183, Suppl. 10. - P. 6561–6568.
130. Souza P.R., Zarate-Blades C.R., Hori J.I. et al. Protective efficacy of different strategies employing *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 against tuberculosis // *Expert. Opin. Biol. Ther.* - 2008. - Vol. 8, Suppl. 9. - P. 1255–1264.
131. Duan M.M., Xu R.M., Yuan C.X. et al. SjHSP70, a recombinant *Schistosoma japonicum* heat shock protein 70, is immunostimulatory and induces protective immunity against cercarial challenge in mice // *Parasitol. Res.* - 2015. - Vol. 114, Suppl. 9. - P. 3415–3429.

132. Randazzo M., Terness P., Opelz G. et al. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited // *Int. J. Cancer*. -2012. - Vol. 130, Suppl. 10. - P. 2219–2231.
133. Bloch O., Crane C.A., Fuks Y. et al.. Heat-shock protein peptide complex-96 vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single-arm trial // *Neuro-Oncology*. -2014. - Vol. 16, Suppl. 2. - P. 274–279.
134. Testori A., Richards J., Whitman E. et al. Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 study group // *J. Clin. Oncol.* - 2008. - Vol. 26, Suppl. 6. - P. 955–962.
135. Wald A., Koelle D.M., Fife K. et al. Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons // *Vaccine*. -2011. - Vol. 29, Suppl. 47. - P. 8520–8529.
136. Einstein M.H., Kadish A.S., Burk R.D. et al. Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III // *Gynecol. Oncol.* - 2007. - Vol. 106, Suppl. 3. - P. 453–460.
137. Goldstone S.E., Palefsky J.M., Winnett M.T. et al. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts // *Dis. Colon Rectum*. -2002. - Vol. 45, Suppl. 4. - P. 502–507.
138. Derkay C.S., Smith R.J., McClay J. et al. HspE7 treatment of pediatric recurrent respiratory papillomatosis: final results of an open-label trial // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* - 2005. - Vol. 114, Suppl. 9. - P. 730–737.
139. Roman L.D., Wilczynski S., Muderspach L.I. et al. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia // *Gynecol. Oncol.* - 2007. - Vol. 106, Suppl. 3. - P. 558–566.
140. Irvine D.J.; Swartz M.A.; Szeto G. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity // *Nat. Mater.* - 2013. - Vol. 12. - P. 978–990.
141. Lee E.J.; Lee N.K.; Kim I.-S. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2016. - Vol. 106. - P. 157–171.
142. Schiller J.T., Lowy D.R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines // *Nat Rev Microbiol.* -2012. - Vol.10. - P. 681–692.
143. Chang L.J., Dowd K.A., Mendoza F.H. et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial // *Lancet*. -2014. - Vol. 384. - P. 2046–2052.

144. Dowd K.A., Mukherjee S., Kuhn R.J. et al. Combined effects of the structural heterogeneity and dynamics of flaviviruses on antibody recognition // *J Virol.* -2014. - Vol. 88. - Suppl. - P. 11726–11737.
145. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature.* -1995. - Vol. 375. - P. 291–298.
146. Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion // *Cell.* -2002. - Vol. 108. - P. 717–725.
147. Kotecha A., Seago J., Scott K. et al. Structure-based energetics of protein interfaces guides foot-and-mouth disease virus vaccine design // *Nat Struct Mol Biol.* -2015. - Vol. 22. - P 788–794.
148. Collins K.A., Snaith R., Cottingham M.G. et al. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine // *Scientific Reports.* -2017. - Vol.7. - P. 46621.
149. Rosenthal J.A., Chen L., Baker J.L. et al. Pathogen-like particles: Biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale // *Curr. Op. in Biotechnol.* -2014. - Vol. 28. - P. 51–58.
150. Mateu M.G. Virus engineering: Functionalization and stabilization // *Protein Engineering, Design & Selection.* -2011. - Vol. 24, Suppl. 1-2. - P. 53–63.
151. Tang S., Xuan B., Ye X. et al. A modular vaccine development platform based on sortase-mediated site-specific tagging of antigens onto virus-like particles // *Scientific Reports.* -2016. - Vol. 6. - P. 25741.
152. Brune K.D., Leneghan D.B., Brian I.J. et al. Plug-and-display: Decoration of virus-like particles via isopeptide bonds for modular immunization // *Scientific Reports.* -2016. - Vol. 6. - P. 19234.
153. Chu X., Li Y., Long Q. et al. Chimeric HBcAg virus-like particles presenting a HPV 16 E7 epitope significantly suppressed tumor progression through preventive or therapeutic immunization in a TC-1-grafted mouse model // *Int J of Nanomed.* -2016. - Vol. 11. - P. 2417–2429.
154. Slupetzky K., Gambhira R., Culp T.D. et al. A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces crossneutralizing antibodies to HPV11 // *Vaccine.* - 2007. - Vol. 25, Suppl. 11. - P. 2001–2010.
155. O'Rourke J.P., Peabody D.S., Chackerian B. Affinity selection of epitope-based vaccines using a bacteriophage virus-like particle platform // *Curr. Op. in Virology.* - 2015. - Vol. 11. - P. 76–82.

156. Kirchmeier M., Fluckiger A.C., Soare C. et al. Enveloped virus-like particle expression of human cytomegalovirus glycoprotein B antigen induces antibodies with potent and broad neutralizing activity // *Clin. and Vac. Immunol.* -2014. - Vol. 21, Suppl. 2. - P. 174–180.
157. Palomares K., Vigant F., Van Handel B. et al. Nipah virus envelope-pseudotyped lentiviruses efficiently target ephrinB2-positive stem cell populations in vitro and bypass the liver sink when administered in vivo // *J. of Virology.* -2013. - Vol. 87, Suppl. 4. - P. 2094–2108.
158. Manayani D.J., Thomas D., Dryden K.A. et al. A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine // *PLOS Pathogens.* -2007. - Vol. 3, Suppl. 10. - e142.
159. Charlton Hume H.K., Lua L.H.L. Platform technologies for modern vaccine manufacturing // *Vaccine.* -2017. - Vol. 35. - P. 4480–4485.
160. De Filette M., Martens W., Smet A. et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies // *Vaccine.* -2008. - Vol. 26, Suppl. 51. - P. 6503–6507.
161. Murata Y., Lightfoote P.M., Rose R.C. et al. Antigenic presentation of heterologous epitopes engineered into the outer surface-exposed helix 4 loop region of human papillomavirus L1 capsomeres // *Virology Journal.* -2009. - Vol. 6. - P. 81.
162. Ye X., Ku Z., Liu Q. et al. Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms // *J. of Virology.* -2014. - Vol. 88, Suppl. 1. - P. 72–81.
163. Anggraeni M.R., Connors N.K., Wu Y. et al. Sensitivity of immune response quality to influenza helix 190 antigen structure displayed on a modular virus-like particle // *Vaccine.* -2013. - Vol. 31, Suppl. 40. - P. 4428–4435.
164. Walker A., Skamel C., Nassal M. SplitCore: An exceptionally versatile viral nanoparticle for native whole protein display regardless of 3D structure // *Sci. Reports.* -2011. - Vol. 1. -P. 5.
165. Lua L.H.L., Fan Y., Chang C. et al. Synthetic biology design to display an 18 kDa rotavirus large antigen on a modular virus-like particle // *Vaccine.* -2015. - Vol. 33, Suppl. 44. - P. 5937–5944.
166. Kratz P. A., Bottcher B., Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids // *PNAS of the USA.* -1999. - Vol. 96, Suppl. 5. - P. 1915–1920.
167. Peyret H., Gehin A., Thuenemann E.C. et al. Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins // *PLOS One.* -2015. - Vol. 10, Suppl. 4. - e0120751.

168. Tekewe A., Fan Y., Tan E. et al. Integrated molecular and bioprocess engineering for bacterially produced immunogenic modular virus-like particle vaccine displaying 18 kDa rotavirus antigen // *Biotech. and Bioeng.*- 2017. - Vol. 114, Suppl. 2. - P. 397–406.
169. Pitoiset F., Vazquez T., Bellier B. Enveloped virus-like particle platforms: Vaccines of the future? *Exp. Rev. of Vaccines.* -2015. - Vol. 14, Suppl. 7. - P. 913–915.
170. Xia M., Huang P., Sun C. et al. Bioengineered norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform // *ACS Nano.* - 2018. - Vol. 12, - P. 10665–10682.
171. Thrane S., Janitzek C.M., Agerbæk M.Ø. et al. A novel virus-like particle based vaccine platform displaying the placental malaria antigen VAR2CSA // *PLOS One.* -2015. - Vol. 10, Suppl. 11. - e0143071.
172. Thrane S., Janitzek C.M., Matondo S. et al. Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines // *J. of Nanobiotech.* -2016. - Vol. 14. - P. 30.
173. Pastori C., Tudor D., Diomedea L. et al. Virus like particle based strategy to elicit HIV protective antibodies to the alpha-helic regions of gp41 // *Virology.* -2012. - Vol. 431, Suppl. 1-2. - P. 1–11.
174. Tissot A.C., Renhofa R., Schmitz N. et al. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines // *PLOS One.* -2010. - Vol. 5, Suppl. 3. - e9809.
175. Janitzek C.M., Matondo S., Thrane S. et al. Bacterial superglue generates a full-length circumsporozoite protein virus-like particle vaccine capable of inducing high and durable antibody responses // *Malaria J.* -2016. - Vol. 15, Suppl. 1. -P 545.
176. Spohn G., Jennings G.T., Martina B.E. et al. A VLP-based vaccine targeting domain III of the West Nile virus E protein protects from lethal infection in mice // *Viol. J.*- 2010. - Vol. 7. - P. 146.
177. Kundig T., Senti G., Schnetzler G. et al. Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults // *J. of Allergy and Clin. Immunol.* -2006. - Vol. 117, Suppl. 6. - P. 1470–1476.
178. Schmitz N., Dietmeier K., Bauer M. et al. Displaying Fel d1 on virus-like particles prevents reactogenicity despite greatly enhanced immunogenicity: a novel therapy for cat allergy // *J Exp Med.* - 2009. - Vol. 206. - P.1941–1955.
179. Wiessner C., Wiederhold K.H., Tissot A.C. et al. The second-generation active A  $\beta$  immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects // *J. of Neuroscience.* -2011. - Vol. 31, Suppl. 25. - P. 9323–9331.



180. Hunter Z., Smyth H.D., Durfee P. et al. Induction of mucosal and systemic antibody responses against the HIV coreceptor CCR5 upon intramuscular immunization and aerosol delivery of a virus-like particle based vaccine // *Vaccine*. -2009. - Vol. 28, Suppl. 2. - P. 403–414.
181. Tissot A.C., Maurer P., Nussberger J. et al. Effect of immunisation against angiotensin II with CYT006-AngQb on ambulatory blood pressure: A double-blind, randomised, placebo-controlled phase IIa study // *Lancet*. -2008. - Vol. 371, Suppl. 9615. - P. 821–827.
182. Jegerlehner A., Zabel F., Langer A. et al. Bacterially produced recombinant influenza vaccines based on virus-like particles // *PLOS One*. -2013. - Vol. 8, Suppl. 11. - e78947.
183. Bessa J., Schmitz N., Hinton H.J. et al. Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: Implications for vaccine design // *Eur J of Immunol*. - 2008. - Vol. 38, Suppl. 1. - P. 114–126.
184. Maurer P., Jennings G.T., Willers J. et al. Frontline: A therapeutic vaccine for nicotine dependence: Preclinical efficacy, and phase I safety and immunogenicity // *Eur J of Immunol*. - 2005. - Vol. 35, Suppl. 7. - P. 2031–2040.
185. Guo Y., Guo R., Ma Y. et al. Chimericvirus-likeparticles of universal antigen epitopes of coronavirus and phage Q $\beta$  coat protein trigger the production of neutralizing antibodies // *Curr Top Med Chem*. - 2021. - Vol. 21, Suppl. 14. - P. 1235-1250.
186. Spohn G., Schori C., Keller I. et al. Preclinical efficacy and safety of an anti-IL-1 $\beta$  vaccine for the treatment of type 2 diabetes // *Mol Ther. Meth & Clin Dev*. -2014. - Vol. 1. - P. 14048.
187. Li Q., Cao C., Chackerian B. et al. Overcoming antigen masking of anti-amyloidbeta antibodies reveals breaking of B cell tolerance by virus-like particles in amyloidbeta immunized amyloid precursor protein transgenic mice // *BMC Neurosci*. -2004. - Vol. 5, Suppl. 1. - P. 21.
188. Chackerian B., Lowy D. R., Schiller J.T. Induction of autoantibodies to mouse CCR5 with recombinant papillomavirus particles // *PNAS*. -1999. - Vol. 96, Suppl. 5. - P. 2373–2378.
189. Liu X.S., Liu W.J., Zhao K.N. et al. Route of administration of chimeric BPV1 VLP determines the character of the induced immune responses // *Immunol and Cell Biol*. -2002. - Vol. 80, Suppl. 1. - P. 21–29.
190. Zhai Y., Zhong Z., Zariffard M. et al. Bovine papillomavirus-like particles presenting conserved epitopes from membrane-proximal external region of HIV-1 gp41 induced mucosal and systemic antibodies // *Vaccine*. -2013. - Vol. 31, Suppl. 46. - P. 5422–5429.
191. Slupetzky K., Shafti-Keramat S., Grassauer A. et al. Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops // *J of General Virol*. -2001. - Vol. 82, Suppl. 11. - P. 2799–2804.

192. Langeveld J.P.M., Brennan F.R., Martín ez-Torrecuadrada J.L. et al. Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus // *Vaccine*. -2001. - Vol. 19, Suppl. 27. - P. 3661–3670.
193. McLain L., Porta C., Lomonosoff G.P. et al. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies raised to a glycoprotein 41 peptide expressed on the surface of a plant virus // *AIDS Res and Hum Retrovir*. -1995. - Vol. 11, Suppl. 3. - P. 327–334.
194. Brennan F.R., Gilleland L.B., Staczek J. et al. A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection // *Microbiol*. -1999. - Vol. 145, Suppl. 8. - P. 2061–2067.
195. Rennermalm A., Li Y. H., Bohaufs L. et al. Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat // *Vaccine*. -2001. - Vol. 19, Suppl. 25-26. - P. 3376–3383.
196. Vitti A., Piazzolla G., Condelli V. et al. Cucumber mosaic virus as the expression system for a potential vaccine against Alzheimer's disease // *J of Virol Methods*. -2010. - Vol. 169, Suppl. 2. - P. 332–340.
197. Nuzzaci M., Piazzolla G., Vitti A. et al. Cucumber mosaic virus as a presentation system for a double hepatitis C virus-derived epitope // *Archives of Virol*. - 2007. - Vol. 152, Suppl. 5. - P. 915–928.
198. Zhao Y., Hammond R.W. Development of a candidate vaccine for Newcastle disease virus by epitope display in the Cucumber mosaic virus capsid protein // *Biotechnol. Letters*. -2005. - Vol. 27, Suppl. 6. - P. 375–382.
199. Chen Y., Xiong X., Liu X. et al. Immunoreactivity of HCV/HBV epitopes displayed in an epitope presenting system // *Mol. Immunol*. -2006. - Vol. 43, Suppl. 5. - P. 436–442.
200. Scodeller E.A.T., Sergio G., Porro F. et al. A new epitope presenting system displays a HIV-1 V3 loop sequence and induces neutralizing antibodies // *Vaccine*. -1995. - Vol. 13, Suppl. 13. - P. 1233–1239.
201. Schneemann A., Speir J.A., Tan G.S. et al. A virus-like particle that elicits crossreactive antibodies to the conserved stem of influenza virus hemagglutinin // *J. of Virol*.- 2012. - Vol. 86, Suppl. 21. - P. 11686–11697.
202. Bandurska K., Brodzik R., Spitsin S. et al. Plant-produced hepatitis B core protein chimera carrying anthrax protective antigen domain-4 // *Hybridoma (2005)*. -2008. - Vol. 27, Suppl. 4. - P. 241–247.
203. Yin Y., Zhang S., Cai C. et al. Deletion modification enhances anthrax specific immunity and protective efficacy of a hepatitis B core particle-based anthrax epitope vaccine // *Immunobiology*. -2014. - Vol. 219, Suppl. 2. - P. 97–103.

204. Arora U., Tyagi P., Swaminathan S. et al. Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice // *Vaccine*. -2013. - Vol. 31, Suppl. 6. - P. 873–878.
205. Mihailova M., Boos M., Petrovskis I. et al. Recombinant virus like particles as a carrier of Band T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV) // *Vaccine*. -2006. - Vol. 24, Suppl. 20. - P. 4369–4377.
206. De Filette M., Martens W., Smet A. et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies // *Vaccine*. -2008. - Vol. 26, Suppl. 51. - P. 6503–6507.
207. Nassal M., Skamel C., Vogel M. et al. Development of hepatitis B virus capsids into a whole-chain protein antigen display platform: New particulate Lyme disease vaccines // *Int. J. of Med. Microbiol.* -2008. - Vol. 298, Suppl. 1-2. - P. 135–142.
208. Kolb P., Wallich R., Nassal M. Whole-chain tick saliva proteins presented on hepatitis b virus capsid-like particles induce high-titered antibodies with neutralizing potential // *PLOS One*. - 2015. - Vol. 10, suppl. 9. - e0136180.
209. Sällberg M., Hughes J., Jones J. et al. A malaria vaccine candidate based on a hepatitis B virus core platform // *Intervirology*. -2002. - Vol. 45, suppl. 4-6. - P. 350–361.
210. Dhanasooraj D., Kumar R.A., Mundayoor S. Vaccine delivery system for tuberculosis based on nano-sized hepatitis B virus core protein particles // *Int. J. of Nanomed.* - 2013. - Vol. 8. - P. 835–843.
211. Eto Y, Saubi N, Ferrer P. et al. Expression of chimeric HPV-HIV protein L1P18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles // *Pharmaceutics*. - 2021. - Vol. 13, Suppl. 11. - P. 1967.
212. Tegerstedt K., Lindencrona J.A., Curcio C. et al. A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors // *Cancer Research*. -2005. - Vol. 65, Suppl. 13. - P. 5953–5957.
213. Eriksson M., Andreasson K., Weidmann J. et al. Murine polyomavirus virus-like particles carrying full-length human PSA protect BALB/c mice from outgrowth of a PSA expressing tumor // *PLOS One*. -2011. - Vol. 6, Suppl. 8. - e23828.
214. Middelberg A.P.J., Rivera-Hernandez T., Wibowo N. et al. A microbial platform for rapid and low-cost virus-like particle and capsomere vaccines // *Vaccine*. -2011. - Vol. 29, Suppl. 41. - P. 7154–7162.

215. Wibowo N., Hughes F.K., Fairmaid E.J. et al. Protective efficacy of a bacterially produced modular capsomere presenting M2e from influenza: Extending the potential of broadly cross-protecting epitopes // *Vaccine*. -2014. - Vol. 32, Suppl. 29. - P. 3651–3655.
216. Waneesorn J., Wibowo N., Bingham J. et al. Structural-based designed modular capsomere comprising HA1 for low-cost poultry influenza vaccination // *Vaccine*. -2016. - Vol. 36. - P. 3064–3071.
217. Wu L.G., Jiang L.B., Zhou Z.A. et al. Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector // *Vaccine*. -2003. - Vol. 21, Suppl. 27–30. - P. 4390–4398.
218. Koo M., Bendahmane M., Lettieri G.A. et al. Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope // *PNAS of the USA*. -1999. - Vol. 96, Suppl. 14. - P. 7774–7779.
219. Haynes J.R., Cunningham J., Von Seefried A. et al. Development of a genetically-engineered, candidate polio vaccine employing the self-assembling properties of the tobacco mosaic-virus coat protein // *Bio-Technology*. -1986. - Vol. 4, Suppl. 7. - P. 637–641.
220. Staczek J., Bendahmane M., Gilleland L.B. et al. Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa* // *Vaccine*. -2000. - Vol. 18, Suppl. 21. - P. 2266–2274.
221. Palmer K.E., Benko A., Doucette S.A. et al. Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes // *Vaccine*. -2006. - Vol. 24, Suppl. 26. - P. 5516–5525.
222. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В. и др. Получение вирусоподобных частиц норовируса (*Caliciviridae; Norovirus*), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (*Picornaviridae; Enterovirus*) // *Вопросы вирусологии*. -2021. - Вып. 66, № 5. - С. 383-389.
223. Huo Y., Ma J., Zheng L. et al. Expression of chimeric proteins based on a backbone of the GII.4 norovirus VP1 and their application in the study of a GII.6 norovirus-specific blockade epitope // *Arch Virol*. - 2022. - Vol. 167, Suppl. 3. - P. 819-827.
224. Panasiuk M., Zimmer K., Czarnota A. et al. Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe cancer immunotherapy // *Nanobiotechnol*. - 2022. - Vol.20, Suppl. 1. - P. 160.

225. Lu T., Behloul N., Zhou Y. et al. Hepatitis E virus capsid as a carrier of exogenous antigens for the development of chimeric virus-like particles // *Intervirology*. - 2022. - Vol. 65, Suppl. 1. - P. 37-48. doi: 10.1159/000515719.
226. Sun X., Xing S., Wang S. et al. In vitro assembly of chimeric virus-like particles composed of a porcine circovirus 2b capsid protein and a B-cell epitope of infectious bursal disease virus // *Biotechnol Lett*. - 2022.- Vol. 44, Suppl. 3. - P. 429-438.
227. Vasconcelos Queiroz A. M., Yanshina Y.A., da Silva Rodrigues E.T. et al. Antibodies response induced by recombinant virus-likeparticles from *Triatoma* virus and chimericantigens from *Trypanosoma cruzi* // *Vaccine*. 2021. -Vol. 39, Suppl. 33. - P. 4723-4732.
228. Grataitong K., Huault S., Chotwiwatthanakun C. et al. Chimericvirus-likeparticles (VLPs) designed from shrimp nodavirus (MrNV) capsid protein specifically target EGFR-positive human colorectal cancer cells. // *Sci Rep*. - 2021. - Vol. 11, Suppl. 1. - P. 16579.
229. Pechsrichuang P., Namwongnao S., Jacquet A. Bioengineering of virus-likeparticles for the prevention or treatment of allergic diseases // *Allergy Asthma Immunol Res*. - 2021. - Vol. 13, Suppl. 1. - P. 23-41.
230. Luo J., Huo C., Qin H. et al. Chimeric enterovirus 71 virus-likeparticle displaying conserved coxsackievirus A16 epitopes elicits potent immune responses and protects mice against lethal EV71 and CA16 infection // *Vaccine*. - 2021. - Vol. 39, Suppl. 30. - P. 4135-4143.
231. Pushko P., Pearce M.B., Ahmad A. et al. Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes // *Vaccine*. -2011. - Vol. 29, Suppl. 35. - P. 5911–5918.
232. Harahap-Carrillo I.S., Ceballos-Olvera I., Valle J.R. Immunogenic subviral particles displaying domain III of dengue 2 envelope protein vectored by measles virus // *Vaccines*. - 2015. - Vol. 3, Suppl. 3. - P. 503–518.
233. Zahmanova G., Mazalovska M., Takova K. et al. Efficient production of chimeric hepatitis B virus-likeparticles bearing an epitope of hepatitis E virus capsid by transient expression in *Nicotiana benthamiana* // *Life (Basel)*. - 2021. - Vol. 11, Suppl. 1. - P. 64.
234. Stoute J.A., Slaoui M., Heppner D.G. et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. For the RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group // *New England J. of Med*. -1997. - Vol 336, Suppl. 2. - P. 86–91.

235. Chua A.J., Vituret C., Tan M.L. et al. A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: Induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies // *Virology*. -2013. - Vol. 10. - P. 129.
236. Whittle L., Chapman R., van Diepen M. et al. Characterization of a novel chimeric *Theileria parva* p67 antigen which incorporates into virus-like particles and is highly immunogenic in mice // *Vaccines (Basel)*. - 2022. - Vol 10, Suppl. 2. - P. 210.
237. Fontana D., Garay E., Cervera L. et al. Chimeric VLPs based on HIV-1 Gag and a fusion rabies glycoprotein induce specific antibodies against rabies and foot-and-mouth disease virus // *Vaccines (Basel)*. - 2021. - Vol. 9, Suppl. 3. - P. 251
238. Carter D.M., Darby C.A., Lefoley B.C. et al. Design and characterization of a computationally optimized broadly reactive hemagglutinin vaccine for H1N1 influenza viruses // *J. of Virology*. -2016. - Vol. 90, Suppl. 9. - P. 4720–4734.
239. Schwartzman L.M., Cathcart A.L., Pujanauski L.M. et al. An intranasal virus-like particle vaccine broadly protects mice from multiple subtypes of influenza A virus // *mBio*. -2015. - Vol. 6, Suppl. 4. - e01044.
240. Song J.M., Wang B.Z., Park K.M. et al. Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity // *PLOS One*. -2011. - Vol. 6, Suppl. 1. - e14538.
241. Ben-Yedidia T. Progress towards a universal influenza vaccine // *Future Virology*. -2011. - Vol. 6, Suppl. 2. - P. 237–248.
242. Kim K.H., Lee Y.T., Hwang H.S. et al. Virus-like particle vaccine containing the F protein of respiratory syncytial virus confers protection without pulmonary disease by modulating specific subsets of dendritic cells and effector T cells // *J. of Virology*. -2015. - Vol. 89, Suppl. 22. - P. 11692–11705.
243. Kurg R., Reinsalu O., Jagur S. et al. Biochemical and proteomic characterization of retrovirus Gag based microparticles carrying melanoma antigens // *Sci. Reports*. -2016. - Vol. 6. - P. 29425.
244. Kirchmeier M., Fluckiger A.C., Soare C. et al. Enveloped virus-like particle expression of human cytomegalovirus glycoprotein B antigen induces antibodies with potent and broad neutralizing activity // *Clin. and Vaccine Immunol.* -2014. - Vol. 21, Suppl. 2. - P. 174–180.
245. Mandell R.B., Koukuntla R., Mogler L.J.K. et al. A replication-incompetent Rift Valley fever vaccine: Chimeric virus-like particles protect mice and rats against lethal challenge // *Virology*. -2010. - Vol. 397, Suppl. 1. - P. 187–198.

246. Haynes J.R., Dokken L., Wiley J.A. et al. Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge // Vaccine. - 2009. - Vol. 27, Suppl. 4. - P. 530–541.