

# СОЗДАНИЕ ИММУНОГЕНА ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА L2E7

И.С. Малахов, Р.И. Аль-Шехадат, И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев

ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Рак шейки матки является одним из наиболее распространенных видов новообразований, занимая 7 место в мире среди всех злокачественных опухолей, и вторым по распространенности онкологическим заболеванием у женщин. Необходимым условием развития рака шейки матки является наличие в клетке ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ): ДНК ВПЧ найдено в 99,7% случаев заболевания. Помимо рака шейки матки, ДНК ВПЧ обнаружено в 85% случаев рака прямой кишки, 50% рака вульвы, вагины и пениса, 20% ротоглоточного рака и 10% гортани и рака пищевода. В России количество женщин, вновь заболевших раком шейки матки в 2009 г., составляет 14 000 человек. По сравнению с 1999 г. рост заболеваемости населения составил 19%. Наиболее эффективной мерой в профилактике практически любой инфекции признана вакцинация. В настоящее время в России доступны две вакцины (Церварикс и Гардасил) против вируса папилломы человека, производимые в Бельгии и Нидерландах соответственно. Церварикс представляет собой бивалентную вакцину, состоящую из вирусоподобных частиц, образуемых при самосборке капсидного вирусного белка L1 ВПЧ типа 16 и 18 (онкогенные штаммы вируса, найденные примерно у 70% больных раком шейки матки). В этом препарате белок L1 ВПЧ экспрессируется в рекомбинантном бакуловирусном векторе; вирусоподобные частицы каждого вирусного штамма производятся отдельно и затем объединяются в один препарат. Гардасил аналогичен Цервариксу, однако в качестве продуцентов используются дрожжи *S. cerevisiae*, и в препарат добавлены вирусоподобные частицы вирусов папилломы человека неонкогенных типов 6 и 11. Таким образом Гардасил является квадριвалентной ВПЧ-6/11/16/18 вакциной. Эти вакцины весьма эффективны в предотвращении инфицирования вирусом и не имеют значимых побочных эффектов, однако они обладают и рядом минусов. В первую очередь это высокая стоимость из-за необходимости их экспрессии в эукариотических клетках. Во-вторых, это их штаммоспецифичность, из-за которой вакцины полностью эффективны только против штаммов вируса, представленных в вакцине. В-третьих, это отсутствие терапевтической (лечение уже установившейся инфекции) ценности данных вакцин. В литературе показано, что N-конец вирусного белка L2 способен генерировать нештаммспецифичные нейтрализующие антитела, блокирующие проникновение вируса в клетку. Белок E7 является вирусным онкогеном, отвечающим за неконтролируемую пролиферацию зараженных клеток, что в хронических случаях приводит к опухолевой трансформации. Этот белок по причине своей незаменимости, как для жизненного цикла вируса, так и для поддержания опухолевого фенотипа раковых клеток, является привлекательной целью терапевтической вакцины. Таким образом, недостатков Гардасила и Церварикса была бы лишена вакцина на основе белков L2 и E7 вируса папилломы человека. Создан штамм-продуцент белка на основе клеток *E. coli*, белок очищен в восстановительных денатурирующих условиях металлоаффинной хроматографией и рефолдирован путем последовательного удаления мочевины и меркаптоэтанола.

**Ключевые слова:** вакцина ВПЧ, папиллома, вирус папилломы человека, белок L2, белок E7, фолдинг.

---

**Адрес для переписки:**

Малахов Ипатий Сергеевич  
197110, Россия, Санкт-Петербург, Корпусная ул., 28, лит. А,  
ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России.  
Тел.: 8 950 038-31-62 (моб.).  
E-mail: ipaty.malakhov@yahoo.com

**Contacts:**

Ipatyi S. Malakhov  
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Korpusnaya str., 28, lit. A,  
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations.  
Phone: +7 950 038-31-62 (mobile).  
E-mail: ipaty.malakhov@yahoo.com

**Библиографическое описание:**

Малахов И.С., Аль-Шехадат Р.И., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.  
Создание иммуногена против вируса папилломы человека на основе  
химерного рекомбинантного белка L2E7 // Инфекция и иммунитет. 2016.  
Т. 6, № 4. С. 345–352. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-345-352

**Citation:**

Malakhov I.S., Al-Shehadat R.I., Duckhovlinov I.V., Simbirtsev A.S. Human  
papilloma virus immunogen creation on the base of chimeric recombinant protein  
L2E7 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016,  
vol. 6, no. 4, pp. 345–352. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-345-352

## HUMAN PAPILLOMA VIRUS IMMUNOGEN CREATION ON THE BASE OF CHIMERIC RECOMBINANT PROTEIN L2E7

Malakhov I.S., Al-Shehadat R.I., Duckhovlinov I.V., Simbirtsev A.S.

*Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia*

**Abstract.** The cervical cancer is one of the most common diseases in world. This malignancy is the seventh highest prevalence oncological disease worldwide and the second highest prevalence oncological disease of women in the world. Meanwhile women need to be infected by human papilloma virus (HPV) is absolutely necessary for it further evolution, HPV DNA was found in 99.97% cases of disease. Except cervical cancer, HPV cause 85% of rectal cancer, 50% of the vulva, vagina and penis cancers, 20% of oropharyngeal cancer and 10% of larynx and esophagus cancers. In 2009, 14 000 women were diagnosed with cervical cancer in Russia. The growth in morbidity was 19% (in comparison with 1999). The most effective recognised measure for almost each infection prophylaxis is a vaccination. Two human papilloma virus vaccines are available in Russia nowadays — Gardasil and Cervarix, produced in Belgium and the Netherlands respectively. Cervarix is a bivalent vaccine based on virus-like particles (VLP) of two types. Recombinant major capsid proteins L1 HPV 16 and HPV 18 express in baculovirus expression system and self-assembled into virus-like particles (about 70 percent of cervical cancers are caused by HPV 16 and HPV 18). VLP of each strain produced in different baculovirus vectors and then combined in single drug. Gardasil is like Cervarix with few exceptions. Producing organisms are fungi *S. cerevisiae* in this case, and this vaccine contains low-risk HPV 6 and HPV 11 VLP. Thus, Gardasil is quadrivalent HPV-6/11/16/18 vaccine. These vaccines are very effective in averting infection of disease and don't have significant side-effects, however they have some disadvantages. Firstly, they have a high price because of necessity of their expression in eukaryotic cells. Secondly, they are strain-specific, so vaccines are completely effective only for virus's strains which are represented in the vaccine. Thirdly, it's the absence of therapeutic (treatment of established infection) value of stated vaccines. According to information from literature, N-terminus of the L2 protein can induce non strain-specific neutralizing antibody that protects organism from papillomavirus challenge. E7 protein is a virus oncogene, its function is unlimited proliferation of infected cells that cause malignization in chronic course of disease. This protein is a very attractive target for therapeutic vaccines because of its necessity both for virus life cycle and sustenance of malignant phenotype in cancer cells. So, in this research the design of immunogen on the base of proteins HPV L2 and E7 is selected, vaccine on the base of which will avoid the disadvantages of Gardasil and Cervarix listed above. The stain-producer of protein on the base of cells *E. coli* was created. The protein was purified in denaturing reducing conditions by metal-affine chromatography and refold by sequential remove of urea and 2-mercaptoethanol.

**Key words:** HPV vaccine, papilloma, human papillomavirus, L2 protein, E7 protein, folding.

### Введение

Вирус папилломы человека (ВПЧ) представляет собой безоболочечный вирус, содержащий двуцепочечную кольцевую ДНК размером примерно 8 тысяч пар оснований. По различным исследованиям, зараженность ВПЧ у женщин по всему миру составляет от 2 до 20% [4], а число женщин, когда-либо в своей жизни имевших контакт с ВПЧ, составляет более 50% [3] от числа сексуально активных женщин. Персистирующая инфекция ВПЧ является наиболее важным этиологическим фактором в развитии рака шейки матки. На сегодняшний день открыто 198 штаммов вируса папилломы человека; общее их число по оценкам достигает четырехсот и более [5]. Примерно полсотни штаммов инфицирует половой тракт, и 13 из них являются онкогенными [18].

Наиболее эффективной мерой в профилактике практически любой инфекции признана вакцинация. Вакцины против вируса папилломы человека можно разделить на профилактические и терапевтические. Профилактические вакцины предотвращают заражение челове-

ка вирусом и основаны на каком-либо белке капсида — L1 и/или L2. К вакцинам на основе белка L1 относятся Гардасил компании Merck и Церварикс компании GlaxoSmithKline. Эти вакцины прошли все фазы клинических испытаний и лицензированы с 2006 г. [36]. Церварикс состоит из вирусоподобных частиц, образуемых при самосборке капсидного белка L1 ВПЧ типа 16 и 18, онкогенных типов вируса, найденных примерно у 70% больных раком шейки матки. L1 экспрессируется с помощью бакуловирусного вектора; вирусоподобные частицы каждого штамма вируса производятся отдельно и затем объединяются в один препарат [29]. Гардасил аналогичен Цервариксу, однако в качестве продуцентов используются 4 штамма дрожжей *S. cerevisiae*. В препарат добавлены вирусоподобные частицы из белка L1 вирусов папилломы человека неонкогенных типов 6 и 11, то есть препарат является квадривалентной ВПЧ-6/11/16/18 вакциной [16]. Гардасил и Церварикс высокоэффективны в предотвращении заражения человека онкогенными типами 16 и 18 ВПЧ, а также филогенетически наиболее близкими к ним штаммами. Однако,

как показано еще на различных штаммах вируса папилломы быков [23], вакцины на основе вирусоподобных L1 частиц эффективны только против штаммов вируса, из которых был взят ген L1. К примеру, Гардасил и Церварикс частично эффективны в предотвращении заражения ВПЧ-31 и ВПЧ-45, и практически неэффективны в отношении ВПЧ-58 [28]. Помимо этого, из-за использования двух (Гардасил) или даже четырех (Церварикс) эукариотических штаммов для производства вирусоподобных частиц данные вакцины довольно дороги.

Альтернативной целью для профилактической ВПЧ вакцины является минорный белок капсида L2. Кролики, вакцинированные N-концом белка L2 вируса папилломы человека типа 16, приобретали иммунитет против вируса папилломы рта кроликов [15]. Исследования, посвященные локализации консервативных нейтрализующих антител, показали их расположение на N-конце молекулы, приблизительно в районе аминокислотных остатков 13–120. Это соотносится с данными о том, что именно этот район в один из этапов заражения находится на поверхности вируса. К примеру, антитела против N-концевых 88 аминокислотных остатков белка L2 вируса папилломы быков 1 активны против других штаммов вируса, в то время как другие домены этого белка не вызывают образования подобных антител [31]. Однако проблемой использования белка L2 в качестве вакцины является его малая иммуногенность. У невакцинированных зараженных животных уровень антител к L2 ниже уровня детекции [6]. Уровень антител при вакцинации рекомбинантным L2 несравненно ниже вызванного вакцинацией L1-вирусоподобными частицами. Таким образом, при создании вакцины на основе L2 необходимо повысить его иммуногенность. Одним из методов решения этой задачи является конкатомеризация N-концов L2 различных штаммов ВПЧ [20, 21, 22, 24]. Повышение иммуногенности в этом случае объясняется наличием в одном белке множества одинаковых эпитопов, что вызывает интернализацию В-клеточных рецепторов на поверхности В-клетки и индукцию ее пролиферации [1]. Использование данного метода позволяет повысить отношение нештаммспецифичных нейтрализующих антител к штаммоспецифичным, так как происходит амплификация идентичных консервативных эпитопов в пределах одной молекулы (в то время как количество идентичных штаммоспецифичных эпитопов остается прежним). Данный подход безопасен, так как не использует потенциально опасных компонентов, и дешев — конкатомеры экспрессируются в *E. coli*.

Что касается лицензированных терапевтических вакцин от ВПЧ, то в настоящее время их

не существует. В виду того, что в малигнизированных клетках из всех вирусных белков экспрессируются только вирусные онкогены E6 и E7 [13], именно они и являются наиболее привлекательной целью иммунотерапии. На основе E7 в настоящее время создается множество терапевтических вакцин [10, 11, 26, 40, 41]

Целью работы было создание белка-иммуногена против онкогенных вирусов папилломы человека, потенциально объединяющего в себе терапевтические и профилактические свойства. В результате был смоделирован химерный белок L2E7, содержащий N-концевые эпитопы вирусных белков L2 (наиболее распространенных у больных раком шейки матки в России [34]) штаммов ВПЧ-16, ВПЧ-18 и ВПЧ-45), а также две полноразмерные копии белков E7 вирусов папилломы человека типа 16 и 18. Домены белка соединены гибкими неиммуногенными пептидными мостиками.

## Материалы и методы

*Синтез и клонирование гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок L2E7.* Синтез последовательностей гена *l2e7* осуществляли методом ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов [42]. В общей сложности для синтеза гибридного гена *l2e7* длиной 1550 п.н. использовали 42 олигонуклеотида. Полученный ген клонировали в векторе pGEM-T Easy, с последующим клонированием в экспрессионной плазмиде pET28a(+) по рестрикционным сайтам NdeI и XhoI. Для амплификации вектора pET28a(+)-*l2e7* трансформировали им клетки *E. coli* штамма DH10B/R (GibcoBRL, США) с генотипом F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM 15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)769 galUgalKλ-rpsLnpG методом электропорации. Клетки *E. coli* проверяли на наличие плазмиды на селективной среде, содержащей LB-агар и 100 мкг/мл канамицина. Полученные колонии *E. coli* использовали для амплификации плазмидной ДНК, содержащей гибридный ген. Очищенную плазмидную ДНК проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

В ходе работы был отобран клон, содержащий фрагмент ДНК требуемого размера в составе плазмиды. Из полученного штамма была выделена плаزمида для создания штамма *E. coli*, используемого для дальнейшей экспрессии целевого гена.

*Создание штамма-продуцента, кодирующего гибридный рекомбинантный белок L2E7.* Для экспрессии гена, кодирующего L2E7, использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США), с генотипом F-ompThsdSB (rB-mB-) galdcM rne131 (DE3), содержащие в ге-

номе  $\lambda$ De3 лизоген и мутацию *rne131*. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее стабильности. *lon*- и *ompT*-мутации по генам протеаз уменьшают протеолитическую деградацию белков. Трансформацию компетентных клеток плазмидой *pET28a(+)-l2e7* осуществляли методом электропорации.

*Индукция экспрессии гибридного гена l2e7.* Осуществляли подбор оптимального протокола индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок L2E7. Для этого производили индукцию экспрессии гибридного гена двумя способами — с помощью изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 1 мМ и 0,2% лактозы по Штудиеру [37]. Индукцию экспрессии гена *l2e7* 1 мМ ИПТГ осуществляли следующим образом: инкубировали клетки при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение ночи в LB среде (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0,6–0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии рекомбинантного гена с помощью добавления ИПТГ к культуре до конечной концентрации 1 мМ. Оставляли на 8 часов для определения оптимального уровня экспрессии белка, после чего клетки центрифугировали с помощью центрифугирования.

Индукцию экспрессии гена *l2e7* 0,2% лактозой (по Штудиеру) осуществляли следующим образом: в среду RYP-5052, содержащую 1% пептон (Gibco, США), 0,5% дрожжевой экстракт (Gibco, США), 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 25 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 0,5% глицерол, 0,05% глюкозу и 0,2% лактозу, канамицин в концентрации 25 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. После ферментирования культуру при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение 16–20 ч до отсутствия существенного изменения ОП600 за 1 ч. Далее отбирали аликвоту клеток на анализ. Контроль экспрессии осуществляли с помощью диск-электрофореза аликвот клеток после индукции. Электрофорез клеточных лизатов проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с использованием на стадии концентрирования образца механизма изотахофореза по Леммли [27].

*Очистка гибридного рекомбинантного белка L2E7.* Очистку гибридного рекомбинантного белка L2E7 проводили с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ сефарозы [19]. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка. Индуцированные клетки-продуценты лизировали с помощью 28 циклов соникации по 15 с с перерывом в 45 с на льду. Тельца включения очищались центрифугированием лизата клеток при 20 000g в течение 20 мин. Затем проводили разрушение телец включения путем их инкубации с лизирующим буфером (20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6 М гуанидин гидрохлорид, 500 мМ хлористый натрий, 20 мМ имидазол, 15 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол) в течение часа. Связывание с колонкой происходило в течение ночи. Далее колонку инкубировали 10 мин при осторожном покачивании (100 об./мин) и комнатной температуре с двумя объемами (относительно объема сорбента) буфера для нанесения (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 15 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, pH 7,8). После этого процедуру последовательно повторили с буфером для промывки, pH 6,0 (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 15 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, pH 6,0) и буфером для промывки, pH 5,0. Элюировали белок инкубацией сорбента в течение 60 мин при осторожном покачивании (100 об./мин) и комнатной температуре с двумя объемами (относительно объема сорбента) буфера для элюции (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 15 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, pH 3,8). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли анализом с использованием бицинхониновой кислоты. Далее материал анализировали диск-электрофорезом по Леммли.

*Рефолдинг гибридного рекомбинантного белка L2E7.* После очистки белка L2E7 на Ni-НТА сорбенте белок находился в денатурированном состоянии в буфере для элюции (8 М мочевины, 15 мМ меркаптоэтанол, 20 мМ натрий фосфатный буфер, 500 мМ хлористый натрий, pH 3,8; рис. 1, дорожка 3). При очистке белка в невосстанавливающих условиях образуются высокомолекулярные агрегаты (рис. 1, дорожка 1).

Для рефолдинга белок диализом перенесли в буфер для рефолдинга-1 (2 М мочевины, 0,4 М L-аргинин, 15 мМ меркаптоэтанол, 100 мМ PBS, 125 мМ хлористый натрий, pH 7,5), после этого центрифугированием в течение 20 мин, 20 000g удалили несфолдированную часть белка, образовавшую агрегаты. После этого белок диализом перенесли в буфер для рефолдинга-2 (1 М мочевины, 100 мМ PBS, pH 7,5); после вто-

рого диализа центрифугированием в течение 20 мин, 20 000g удалили несфолдированную часть белка, образовавшую агрегаты.

Указанный протокол выбрали из других испытанных нами методов (таких как очистка и рефолдинг без применения 2-меркаптоэтанола, замена меркаптоэтанола парой окисленный/восстановленный глутатион, понижение концентрации мочевины и удаление меркаптоэтанола за один сеанс диализа, рефолдинг без L-аргинина, замена L-аргинина сахарозой, использование сахарозы совместно с L-аргинином, рефолдинг при различных значениях pH) по наибольшему выходу сфолдированного белка.

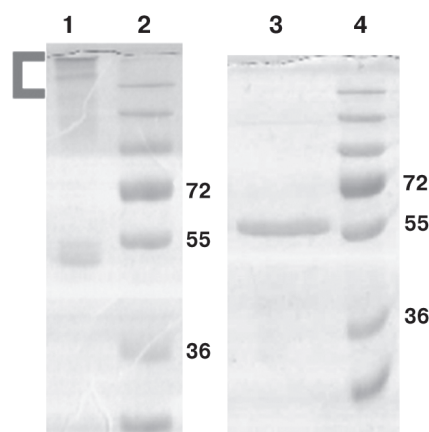
## Результаты

Смоделирован гибридный белок — L2E7, содержащий N-концы белков L2 вирусов папилломы человека типа 16, 18 и 45, а также 2 полно-размерные копии белков E7 вирусов папилломы человека типа 16 и 18. После встраивания гена L2E7 в вектор pet28a (+) по сайтам рестрикции NdeI и XhoI белковый продукт получил полигистидиновую метку. Анализ полученной последовательности в программе UniPro UGENE v.1.16.2 показал, что химерный белок имеет размер 480 аминокислот, молекулярную массу 50,8 kDa и pI 6,18.

Создан штамм-продуцент на основе клеток *E. coli* штамма BL21 (DE3), трансформированных вектором pet28a (+) *l2e7*. Изучили экспрессию гибридного гена *l2e7* при использовании в качестве индуктора 1 mM ИПТГ и 0,2% лактозой по Штудиеру. Подобрали оптимальный прокол индукции экспрессии L2E7 — метод автоиндукции, который является оптимальным по выходу белка и затратам на его осуществление. Получен высокоочищенный гибридный рекомбинантный белок L2E7 металлоаффинной хроматографией с Ni-НТУ сефарозой. Разработан протокол рефолдинга белка L2E7.

## Обсуждение

L2E7 содержит в себе N-концевые части белка L2 трех наиболее высокоонкогенных штаммов вируса, распространенных в России. В ходе естественно протекающей инфекции слабый иммунитет развивается только против белка L1 [8, 31]. В то же время белок L2 большую часть времени скрыт внутри капсида, при этом его количество в самом капсиде составляет максимум 72 копии против 360 копий молекулы L1. Вследствие низкой иммуногенности белка L2 в естественно протекающей инфекции антител против него не возникает вовсе [6]. Однако N-конец белка L2 содержит консервативные эпитопы, к которым возможно образование



**Рисунок 1. Электрофореграммы, полученные при очистке белка L2E7 металлоаффинной хроматографией. Метод SDS-электрофореза по Лэмбли в невосстанавливающих условиях**

При пробоподготовке в пробы не был добавлен восстанавливающий агент.

1 — L2E7 после очистки на Ni-НТУ сорбенте в невосстанавливающих условиях (белок в 8 М мочевины и 20 mM натрий фосфатном буфере). Скобкой отмечены предположительно высокомолекулярные агрегаты L2E7. 2, 4 — маркеры молекулярного веса Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas).

3 — L2E7 после очистки на Ni-НТУ сорбенте в восстанавливающих условиях (белок в 8 М мочевины, 20 mM натрий фосфатном буфере, 15 mM β-меркаптоэтаноле).

нейтрализующих антител [14, 20, 33]. В литературе описаны успешные попытки повышения иммуногенности N-конца молекулы L2 путем слияния в одном белке N-концов белка L2 сразу нескольких штаммов [20, 21, 22, 24].

Вакцины на основе капсидных белков вируса папилломы человека могут предотвратить заражение вирусом, но не могут элиминировать уже установившуюся инфекцию. Для терапевтической активности кандидатного иммуногена в него были введены копии белка E7 двух наиболее высокоонкогенных штаммов вируса, распространенных в России. Вирусный протонкоген E7 индуцирует трансформацию клеток хозяина взаимодействием со множеством клеточных белков-мишеней, основным из которых является pRb. Инактивация этого белка является главной функцией E7; эффективность трансформации клетки напрямую коррелирует с аффинностью E7 к pRb [17]. К разрабатываемым вакцинам, имеющим в своем составе E7, входят Пентарикс [41], TA-CIN [10], SGN-00101 [40] и другие.

Для облегчения рефолдинга независимые домены в рекомбинантном белке отделены друг от друга гибкими неиммуногенными пептидными мостиками. Высокая вероятность правильного рефолдинга L2E7 подтверждается

моделированием третичной структуры иммуногена, выполненным на основе первичной последовательности белка алгоритмом I-Tasser [35, 43, 44] (рис. 2, III обложка).

При очистке и рефолдинге химерного белка L2E7 было обнаружено, что уже в элюирующем буфере в денатурированном белке начинается образование дисульфидных связей. Для предотвращения окисления белка в элюирующие буферы был добавлен 15 мМ β-меркаптоэтанол. Концентрация меркаптоэтанола выбиралась исходя из того, что максимально допустимая его концентрация при работе с Ni-NTA сорбентом составляет 20 мМ [32].

Проблематичное рефолдирование кандидатного иммуногена L2E7 по всей видимости связано с образованием некорректных дисульфидных связей между остатками цистеина в N-концевых фрагментах L2 и цинк-связывающих сайтов E7. Всего в одной молекуле L2E7 20 остатков цистеина, которые потенциально могут образовывать дисульфидные связи — по 2 остатка цистеина на каждый фрагмент L2 и по 7 остатков в каждой копии E7. В естественных условиях E7 не образует дисульфидные связи [30], так как, помимо того, что белок находится в цитоплазме клетки (где преобладают восстанавливающие условия), остатки цистеина в правильно свернутой молекуле пространственно разобщены друг от друга. По одной дисульфидной связи в естественных условиях должно образовываться в каждом фрагменте N-конца L2 [7]. Некорректное взаимодействие между остатками цистеина фрагментов L2 и остатками цистеина E7 предполагается, исходя из-за анализа литературы. Рекомбинантный белок, состоящий из пяти слитых N-концов белков L2 различных штаммов вируса, успешно ренатурировался одноступенчатым диализом против PBS [20], то же самое относится и к Пентариксу, молекуле, состоящей из 5 слитых вместе копий E7 различных штаммов вируса папилломы человека [41]. Однако в случае слитых вместе белков L2 и E7 (например, рекомбинантного белка L2E6E7 [12], вакцины Та-CIN, состоящей из слитых L2, E6 и E7 ВПЧ-16 [25], а также рекомбинантного белка, состоящего из L2 и E7 ВПЧ-6 [38]), в работах упоминается очистка белка в восстанавливающих условиях. Это, очевидно, говорит о проблеме корректного образования дисульфидных связей при рефолдинге данных бел-

ков. При этом в упомянутых статьях экспрессия белков, состоящих из фрагментов L2 и/или E7, в *E. coli*, приводит к образованию телец включения, что говорит о неспособности данных белков правильно фолдироваться в условиях цитоплазмы *E. coli*.

Метод рефолдирования белка, потенциально образующего дисульфидные связи, был предложен Анфинсеном в 1961 г. [2]. В его эксперименте по рефолдированию денатурированной в 8 М мочевины и восстановительных условиях РНКазы А 90% активной формы данного фермента было получено при снижении концентрации мочевины с дальнейшим удалением меркаптоэтанола. При одновременном снижении концентраций мочевины и β-меркаптоэтанола, а также при удалении сначала β-меркаптоэтанола, а затем мочевины, выход активной РНКазы А колебался в районе 1%. Предположительно, при снижении концентрации мочевины происходит сворачивание восстановленного белка с пространственным сближением тех остатков цистеина, которые в нативной форме образуют дисульфидную связь. При последующем удалении восстанавливающего агента происходит образование корректных дисульфидных связей. Для рефолдинга молекулы химерного рекомбинантного белка L2E7 концентрация мочевины снижалась с 8 М до 2 М с сохранением концентрации меркаптоэтанола. Именно при 2 М концентрации мочевины начинается связывание мочевины с молекулой белка [39] и образование денатурированных молекул белка [9]. Видимо при таком содержании мочевины в растворе белок находится в пограничном состоянии между «расплавленной глобулой» и полностью фолдированным белком. Исходя из этого, для окончательного фолдирования L2E7, образования дисульфидных связей, а также нивелирования возможного влияния L-аргинина и повышенной концентрации мочевины на процесс иммунизации (планируемый в дальнейшем), пробу белка диализовали еще раз для удалением β-меркаптоэтанола и понижения концентрации мочевины до 1 М. Таким образом, растворимость белка в фосфатном буфере без добавления меркаптоэтанола, а также отсутствие высокомолекулярных полос при электрофорезе в невосстанавливающих условиях, позволяют предположить корректное сворачивание белка L2E7 при выбранной схеме рефолдинга.

## Список литературы/References

1. Ярилин А.А. Иммунология. ГЭОТАР Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunologiya [Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, 752 p.]
2. Anfinsen C.B., Haber E., Sela M., White F.H. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1961, vol. 47, no. 9, p. 1309. doi: 10.1073/pnas.47.9.1309
3. Baseman J.G., Koutsky L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J. Clin. Virol.*, 2005, vol. 32, pp. 16–24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008

4. Bosch F.X., De Sanjosé S. Human papillomavirus and cervical cancer — burden and assessment of causality. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, vol. 2003, no. 31, pp. 3–13. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003479
5. Bzhalava D., Eklund C., Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 2015, vol. 476, pp. 341–344. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.028
6. Campo M.S., Grindlay G.J., O'Neil B.W., Chandrachud L.M., McGarvie G.M., Jarrett W.F. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *J. Gen. Virol.*, 1993, vol. 74, pp. 945–953. doi: 10.1099/0022-1317-74-6-945
7. Campos S.K., Ozbun M.A. Two highly conserved cysteine residues in HPV16 L2 form an intramolecular disulfide bond and are critical for infectivity in human keratinocytes. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 2, e4463. doi: 10.1371/journal.pone.0004463
8. Christensen N.D., Cladel N.M., Reed C.A., Budgeon L.R., Embers M.E., Skulsky D.M., McClements W.L., Ludmerer S.W., Jansen K.U. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology*, 2001, vol. 291, no. 2, pp. 324–334. doi: 10.1006/viro.2001.1220
9. Creighton T.E. Kinetic study of protein unfolding and refolding using urea gradient electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 1980, vol. 137, no. 1, pp. 61–80. doi: 10.1016/0022-2836(80)90157-6
10. Daayana S., Elkord E., Winters U., Pawlita M., Roden R., Stern P.L., Kitchener H.C. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer*, 2010, vol. 102, no. 7, pp. 1129–1136. doi: 10.1038/sj.bjc.6605611
11. Demurtas O.C., Massa S., Ferrante P., Venuti A., Franconi R., Giuliano G.A. Chlamydomonas-derived Human Papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 4, pp. E61473. doi: 10.1371/journal.pone.0061473
12. Fang-Cheng Z., Gang C., Jie W., Su-Feng J., Yun-Shui J., Men G., Jian-Buo L., Li Z., Zian M., Houwen T. Evaluation of pre-clinical efficacy to HPV16 L2E6E7 vaccine and HPV16 E6E7 adenovirus-5 vector vaccine with different dosages and prime-booster regimens in mouse model. *J. Vaccines Vaccin.*, 2013, vol. 4, pp. 1–4. doi: 10.4172/2157-7560.1000189
13. Frazer I.H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, vol. 4, no. 1, pp. 46–55. doi: 10.1038/nri1260
14. Gambhira R., Karanam B., Jagu S., Roberts J.N., Buck C.B., Bossis I., Alphs H., Culp T., Neil D., Christensen N.D., Roden R.B. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 24, pp. 13927–13931. doi: 10.1128/JVI.00936-07
15. Gambhira R., Jagu S., Karanam B., Gravitt P.E., Culp T.D., Christensen N.D., Roden R.B. Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of human papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 21, pp. 11585–11592. doi: 10.1128/JVI.01577-07
16. Govan V.A. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil®). *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2008, vol. 4, no. 1, p. 65. doi: 10.2147/TCRM.S856
17. Heck D.V., Yee C.L., Howley P.M., Münger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, no. 10, pp. 4442–4446. doi: 10.1073/pnas.89.10.4442
18. International Agency for Research on Cancer, IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC*, 2012, vol. 100B. doi: 10.1016/s0378-8741(03)00216-2
19. Invitrogen. Ni-NTA purification system. User manual. Catalog nos. K950-01, K951-01, K952-01, K953-01, K954-01, R901-01, R901-10, R 901-15. Version C. 25-0496, 2006, 32 p.
20. Jagu S., Karanam B., Gambhira R., Chivukula S.V., Chaganti R.J., Lowy D.R., Schiller J.T., Roden R.B. Concatenated multi-type L2 fusion proteins as candidate prophylactic panhuman papillomavirus vaccines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, vol. 101, no. 11, pp. 782–792. doi: 10.1093/jnci/djp106
21. Jagu S., Kwak K., Karanam B., Huh W. K., Damotharan V., Chivukula S.V., Roden R.B. Optimization of multimeric human papillomavirus L2 vaccines. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 1, e55538. doi: 10.1371/journal.pone.0055538
22. Jagu S., Kwak K., Garcea R.L., Roden R.B. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 28, pp. 4478–4486. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.039
23. Jarrett W.F., O'Neil B.W., Gaukroger J.M., Smith K.T., Laird H.M., Campo M.S. Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types. *Vet. Rec.*, 1990, vol. 126, no. 19, pp. 473–475. doi: 10.1136/vr.126.19.473
24. Kalnin K., Tibbitts T., Yan Y., Stegalkina S., Shen L., Costa V., Sabharwal R., Anderson S.F., Day P.M., Christensen N., Schiller J.T., Jagu S., Roden R.B., Almond J., Kleanthous H. Low doses of flagellin-L2 multimer vaccines protect against challenge with diverse papillomavirus genotypes. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 28, pp. 3540–3547. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.032
25. Karanam B., Gambhira R., Peng S., Jagu S., Kim D.J., Ketner G.W., Stern P.L., Adams R.J., Roden R.B. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 7, pp. 1040–1049. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.099
26. Kawana K., Adachi K., Kojima S., Taguchi A., Tomio K., Yamashita A., Nishida H., Nagasaka K., Arimoto T., Yokoyama T., Wada-Hiraike O., Oda K., Sewaki T., Osuga Y., Fujii, T. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 47, pp. 6233–6239. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.020
27. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. doi: 10.1016/0022-2836(73)90198-8
28. Malagón T., Drolet M., Boily M.C., Franco E. L., Jit M., Brisson J., Brisson M. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, no. 10, pp. 781–789. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70187-1
29. Monie A., Hung C.F., Roden R., Wu T.C. Cervarix™: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics.*, 2008, vol. 2, no. 1, pp. 107. doi: 10.2147/BTT.S1877

30. Ohlenschläger O., Seiboth T., Zengerling H., Briese L., Marchanka A., Ramachandran R., Baum M., Korbas M., Meyer-Klaucke W., Dürst M., Görlach M. Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene*, 2006, vol. 25, no. 44, pp. 5953–5959. doi: 10.1038/sj.onc.1209584
31. Pastrana D.V., Buck C.B., Pang Y.S., Thompson C.D., Castle P.E., Fitzgerald P.C., Kjaer S.K., Lowy D.R., Schiller J.T. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology*, 2004, vol. 321, no. 2, pp. 205–216. doi: 10.1016/j.virol.2003.12.027
32. QIAGEN. Compatibility of reagents with Ni-NTA. *QIAGEN*, 2006.
33. Roden R.B., Yutzy W.H., Fallon R., Inglis S., Lowy D.R., Schiller J.T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*, 2000, vol. 270, no. 2, pp. 254–257. doi: 10.1006/viro.2000.0272
34. Rogovskaya S.I., Shabalova I.P., Mikheeva I.V., Minkina G.N., Podzolkova N.M., Shipulina O.Y., Sultanov S.N., Kosenko I.A., Brotons M., Buttman N., Dartell M., Arbyn M., Syrjänen S., Poljak M. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Russian Federation, the Western Countries of the former Soviet Union, Caucasus Region and Central Asia. *Vaccine*, 2013, vol. 31, pp. H46–H58. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.043
35. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 725–738. doi: 10.1038/nprot.2010.5
36. Schiller J.T., Castellsagué X., Villa L.L., Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*, 2008, vol. 26, pp. K53–K61. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.002
37. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 207–234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016
38. Thompson H.S.G., Davies M.L., Watts M.J., Mann A.E., Holding F.P., O’Neill T., Beech J.T., Thompson S.J., Leesman G.D., Ulrich J.T. Enhanced immunogenicity of a recombinant genital warts vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A. *Vaccine*, 1998, vol. 16, no. 20, pp. 1993–1999. doi: 10.1016/S0264-410X(98)00088-7
39. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, 2003, vol. 28, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1016/S1046-5928(02)00641-1
40. Van Doorslaer K., Reimers L.L., Studentsov Y.Y., Einstein M.H., Burk R.D. Serological response to an HPV16 E7 based therapeutic vaccine in women with high-grade cervical dysplasia. *Gynecol. Oncol.*, 2010, vol. 116, no. 2, pp. 208–212. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.05.044
41. Wick D.A., Webb J.R. A novel, broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HPV16, 18, 31, 45 and 52 that elicits potent E7-specific CD8T cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 44, pp. 7857–7866. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.090
42. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Li X., Fan H.Q., Cheng Z.M., Li Y. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, no. 12, pp. e98–e98. doi: 10.1093/nar/gnh094
43. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 7–8. doi: 10.1038/nmeth.3213
44. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 2008, vol. 9, no. 1, p. 40. doi: 10.1186/1471-2105-9-40

**Авторы:**

**Малахов И.С.**, магистр биологии, инженер 1 категории лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;  
**Аль-Шехадат Р.И.**, к.б.н., зам. зав. лабораторией генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;  
**Духовлинов И.В.**, к.б.н., зав. лабораторией генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;  
**Симбирцев А.С.**, член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор, директор ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Malakhov I.S.**, Master (Biology), Engineer, Genetic Engineering Vaccine Laboratory, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Al-Shehadat R.I.**, PhD (Biology), Deputy of Head of the Genetic Engineering Vaccine Laboratory, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Dukhovlinov I.V.**, PhD (Biology), Head of the Genetic Engineering Vaccine Laboratory, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Simbirtsev A.S.**, RAS Corresponding Member, PhD, MD (Biology), Professor, Director of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.08.2016  
 Отправлена на доработку 05.10.2016  
 Принята к печати 20.10.2016

Received 31.08.2016  
 Revision received 05.10.2016  
 Accepted 20.10.2016