

*Блохина Е.А., Равин Н.В.*

## КОНСТРУИРОВАНИЕ МОЗАИЧНЫХ НВс-ЧАСТИЦ, НЕСУЩИХ КОНСЕРВАТИВНЫЕ УЧАСТКИ М2-БЕЛКА И ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А

Институт биоинженерии ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва

Вирусоподобные НВс-частицы, образуемые в результате самосборки ядерного антигена вируса гепатита В, могут быть использованы в качестве высокоиммуногенного носителя для презентации чужеродных эпитопов при создании рекомбинантных вакцин. Мы используем этот носитель для разработки противогриппозных вакцин, основанных на консервативных антигенах вируса гриппа, – внеклеточном домене трансмембранного белка М2 (М2е) и фрагменте второй субъединицы гемагглютинина (НА2). Представление на поверхности НВс-частиц должно повысить иммуногенность этих пептидов. С использованием методов генетической инженерии мы получили гибридный белок, в котором последовательность НА2 присоединена на N-конец НВс-антигена, а М2е-пептид включён в район иммунодоминантной петли, экспонируемой на поверхности НВс- частиц. Гибридный белок, выделенный из штамма-продуцента *Escherichia coli* в денатурирующих условиях, образовывал вирусоподобные НВс-частицы после рефолдинга *in vitro*. Рефолдинг этого белка в присутствии предварительно денатурированного НВс-антигена, не содержащего чужеродных вставок, позволил получить мозаичные вирусоподобные частицы. Разработанный нами метод позволит создавать мозаичные НВс-частицы, несущие различные целевые эпитопы вируса гриппа за счёт комбинации соответствующих модифицированных НВс-белков, что открывает возможность создания противогриппозных вакцин с более широким спектром защиты.

Ключевые слова: *вирусоподобная частица; НВс-антиген; грипп; рекомбинантная вакцина; М2-белок; гемагглютинин.*

*Для цитирования:* Блохина Е.А. Равин Н.В. Конструирование мозаичных НВс-частиц, несущих консервативные участки М2-белка и гемагглютинина вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(3): 130-135.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-130-135>

*Blokhina E.A., Ravin N.V.*

## CONSTRUCTION OF MOSAIC HBc PARTICLES PRESENTING CONSERVATIVE FRAGMENTS OF M2 PROTEIN AND HEMAGGLUTININ OF INFLUENZA A VIRUS

Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation

Virus-like HBc particles formed as a result of the self-assembly of the nuclear antigen of the hepatitis B virus can be used as a highly immunogenic carrier for the presentation of foreign epitopes when creating recombinant vaccines. We use this vehicle to create influenza vaccines based on the conservative antigens of the influenza virus, the extracellular domain of the transmembrane protein M2 (M2e) and the fragment of the second subunit of hemagglutinin (HA2). Presentation on the surface of HBc particles should improve the immunogenicity of these peptides. Using genetic engineering techniques, we obtained a fusion protein in which the HA2 sequence is attached to the N-terminus of the HBc antigen, and the M2e peptide is included in the immunodominant loop region exposed on the surface of HBc particle. The hybrid protein expressed in *Escherichia coli* and purified under denaturing conditions formed virus-like HBc particles after refolding *in vitro*. Refolding of this protein in the presence of a previously denatured HBc antigen carrying no inserts resulted in formation of mosaic virus-like particles. The developed method will allow construction of mosaic HBc particles carrying different target epitopes of the influenza virus by combining the corresponding modified HBc proteins, which opens the possibility of creating vaccines with a wider spectrum of protection.

Key words: *virus-like particle; HBc antigen; influenza; recombinant vaccine; M2 protein; hemagglutinin.*

*For citation:* Blokhina E.A., Ravin N.V. Construction of mosaic HBc particles presenting conservative fragments of M2 protein and hemagglutinin of influenza A virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2018; 63(3): 130-135. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-130-135>

*For correspondence:* Elena A. Blokhina, PhD, research scientist of the Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation. E-mail: [blokhina-lena87@mail.ru](mailto:blokhina-lena87@mail.ru)

### *Information about authors:*

Blokhina E.A., <https://orcid.org/0000-0002-6038-3715>

Ravin N.V., <http://orcid.org/0000-0002-1456-1832>

*Acknowledgment.* The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 16-34-00976).

*Conflict of interest.* The authors declare no conflict of interest.

Received 20 November 2017

Accepted 12 December 2017

*Для корреспонденции:* Блохина Елена Александровна, канд. биол. наук, научный сотрудник, Институт биоинженерии ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва. E-mail: [blokhina-lena87@mail.ru](mailto:blokhina-lena87@mail.ru)

## Введение

Рекомбинантные вирусоподобные частицы (ВПЧ), образующиеся в результате самосборки капсидных белков вирусов, могут быть использованы в качестве носителей чужеродных антигенов для разработки вакцин и диагностических средств. К числу наиболее широко используемых относятся ВПЧ, образуемые ядерным антигеном вируса гепатита В (НВс-частицы), поскольку они обладают высокой иммуногенностью, стабильностью, могут быть получены в различных системах гетерологической экспрессии и модифицированы методами генетической и белковой инженерии [1, 2].

НВс-частицы существуют в двух формах, состоящих из 180 или 240 копий субъединиц, которые в форме димеров собираются в симметричные икосаэдрические структуры, диаметр которых составляет 30 или 34 нм [3]. Вставки чужеродных пептидов могут быть осуществлены на генетическом уровне на N- или C-концы НВс-антигена либо между аминокислотами Asp78 и Pro79 в районе выступающей на поверхности НВс-частицы «иммунодоминантной» петли [4, 5]. Включения в этот участок наиболее перспективны для создания вакцин, поскольку иммунный ответ при вакцинации такими рекомбинантными НВс-частицами будет направлен в основном против включённого эпитопа [2]. В районе иммунодоминантной петли без нарушения сборки ВПЧ могут быть включены достаточно большие пептиды. Так, включение в этот район последовательности зелёного флуоресцентного белка (238 аминокислотных остатков – а.о.) не нарушало не только формирование ВПЧ, но и его способность флуоресцировать [6]. Однако структура включённого пептида должна соответствовать конформации акцепторного сайта, поэтому во многих случаях включение чужеродных пептидов приводило к образованию нерастворимого продукта и/или нарушало сборку химерных НВс-частиц [7].

Одним из путей решения этой проблемы может быть разграничение последовательности НВс-антигена и вставки специальными линкерами. Для этого часто используют гидрофильные богатые глицином последовательности, обеспечивающие гибкость всей структуры рекомбинантного белка [8]. Другим способом получить НВс-частицы, несущие такие «сложные» антигены, является получение мозаичных ВПЧ в результате совместной экспрессии немодифицированного НВс-антигена и НВс-антигена с чужеродной вставкой [9, 10]. Такие частицы будут нести меньшее количество эпитопов на своей поверхности, но обладать большей стабильностью за счёт немодифицированных молекул НВс. Поскольку НВс-частицы могут собираться из мономеров как *in vivo*, так и *in vitro*, для регулирования доли молекул НВс-антигена со вставкой в мозаичных частицах можно использовать метод совместного рефолдинга НВс-белков со вставкой и без неё. Кроме того, рефолдинг и сборка *in vitro* НВс-частиц после предварительной очистки белка в денатурирующих условиях позволяют получить ВПЧ с более высокой степенью чистоты, поскольку сформированные *in vivo* частицы могут при сборке включать компоненты клетки-продуцента [11].

НВс-частицы могут быть использованы в качестве носителя консервативных антигенов вируса гриппа А для разработки рекомбинантных противогриппозных вакцин [12]. В отличие от традиционных сезонных противогриппозных вакцин, которых обеспечивают иммунный ответ против вариабельных поверхностных антигенов вируса, гемагглютинина и нейраминидазы, использование консервативных антигенов даёт перспективу получения «универсальной» противогриппозной вакцины, защищающей от широкого спектра штаммов вируса гриппа А [13]. Наиболее перспективным кандидатом является внеклеточный домен трансмембранного белка М2 (М2е-пептид). Этот небольшой пептид (24 а.о., включая

N-концевой метионин) отличается высокой консервативностью у штаммов вируса гриппа А человека различных субтипов [12, 14]. Однако М2е-пептид обладает низкой иммуногенностью [15] и для индукции эффективного иммунного ответа должен быть присоединён к высокоиммуногенному адьюванту или носителю [13]. Ранее нами была показана возможность встраивания до 4 копий М2е-пептида в район иммунодоминантной петли НВс [16]. Такие ВПЧ обладали высокой иммуногенностью и обеспечивали защиту иммунизированных животных от заражения различными штаммами вируса гриппа А [17].

Однако основным антигеном вируса гриппа и наиболее важным компонентом вакцины, вызывающим (в отличие от М2е) образование вируснейтрализующих антител, является гемагглютинин. Вторая субъединица гемагглютинина (НА2) образует «стебель» молекулы гемагглютинина и менее подвержена мутационным изменениям, что позволило получить на основе соответствующего пептида препарат, обеспечивающий защиту от различных штаммов вируса гриппа [18]. Сочетание М2е- и НА2-пептидов в вакцинном препарате может обеспечить более разнообразный спектр антител у иммунизированных животных и повысить эффективность «универсальной» вакцины [19, 20].

Целью нашей работы было конструирование НВс-частиц, несущих одновременно консервативные пептиды М2е и НА2 вируса гриппа.

## Материал и методы

### *Пептиды вируса гриппа и богатые глицином линкеры*

В ходе работы были использованы последовательности М2е-пептида вируса гриппа штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (SLLTEVETPTRNEWESRSDSSD, М2еk), а также консенсусная последовательность консервативного участка второй субъединицы гемагглютинина НА2 потенциально пандемического штамма A/H2N2 от 35 до 107 а. о. (AADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERT [20]). Оптимизированную для экспрессии в *Escherichia coli* по составу кодонов нуклеотидную последовательность, кодирующую этот белок, синтезировали *in vitro*. В качестве богатых глицином линкеров использовали последовательности Gly19 (GTSGSSGSGSGSGSGGGG) и Gly10 (GGGGSGGGG). Нуклеотидная последовательность, кодирующая Gly10, была получена в виде синтетического гена.

### *Конструирование экспрессионных векторов*

Для экспрессии белка НВс без вставок чужеродных пептидов использовали плазмиду pQE60-НВс, содержащую укороченную последовательность гена НВс, кодирующую НВс-антиген с 4 по 149 а.о., за которыми следует C-концевой цистеин [21].

Для встраивания последовательности НА2 на N-конец НВс-антигена использовали экспрессионный вектор pQE60-НВс/М2еk [16], кодирующий белок НВс/М2еk, содержащий одну копию М2е-пептида в районе иммунодоминантной петли НВс. Последовательность М2е-пептида в этом белке фланкирована последовательностями линкера Gly19. С помощью ПЦР на 5'-конец гена НВс/М2еk ввели дополнительные рестрикционные сайты NruI и EheI, по которым в дальнейшем проводили последовательное введение синтетических последовательностей двух копий богатого глицином линкера Gly10 и НА2.

Таким образом была получена плаزمиды pQE60-НА2-НВс/М2еk, содержащая ген гибридного белка НА2-НВс/М2еk, включающего последовательность НВс-антигена, слитого с пептидом НА2 на N-конце молекулы, и включающего М2е-пептид в иммунодоминантной петле. Ген НА2-НВс/М2еk вырезали из этой плазмиды и клонировали по сайтам NcoI и HindIII в вектор p-ETM-10 (EBML), в результате чего был получен экспрессионный вектор pETM-10 НА2-НВс/М2еk.

### Создание штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, выделение целевых белков

Экспрессионные векторы pQE60-НВс и рЕТМ-10 HA2-НВс/М2ек вводили с помощью трансформации в штаммы *Escherichia coli* JM109 и BL21(DE3) соответственно. Для экспрессии целевых белков штаммы-продуценты выращивали в среде LB при 37°C на шейкере до середины логарифмической фазы роста ( $OD_{600} \sim 0,5-0,7$ ), затем вносили изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до 1 мМ и продолжали выращивать в тех же условиях в течение 12–16 ч. После индукции клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере для лизиса (15 мМ фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,2; лизоцим 1 мг/мл) и инкубировали в течение 40 мин при 4°C. Разрушение клеток проводили посредством 6-кратной обработки ультразвуком по 30 с с интервалом 1 мин (Diagenode Bioprotor UCD 200). Клеточный лизат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге Mikro 20 («Hettich», Германия). Для очистки белка HA2-НВс/М2ек отбирали осадок, для очистки НВс-частиц использовали супернатант.

Очистку белка HA2-НВс/М2ек проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-сорбенте в денатурирующих условиях. Для полной денатурации белка осадок после центрифугирования клеточного лизата суспендировали в денатурирующем буфере (15 мМ ФСБ pH 7,4; 6 М мочевины; 0,5 М NaCl) и инкубировали в течение 12–16 ч при 10°C. Нерастворимую фракцию удаляли путем центрифугирования (13 000 об/мин – 10 мин). К супернатанту добавляли имидазол до 10 мМ и выполняли сорбцию на HisLink Protein Purification Resin («Promega», США). Отмывку несвязавшихся белков проводили денатурирующим буфером с содержанием 20 мМ имидазола. Элюцию проводили в денатурирующих условиях (15 мМ ФСБ pH 7,4; 6 М мочевины; 0,5 М NaCl; 0,3 М имидазол).

Концентрацию белков в растворе определяли методом Бредфорда.

#### Очистка НВс-частиц

Очистку не содержащих вставку НВс-частиц выполняли с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности цезий хлористый – сахарозы. В поликарбонатные пробирки настилали последовательно начиная со дна пробирки растворы: 1,5 г/л хлористого цезия – 2 мл и 1,2 г/л хлористого цезия – 3 мл; 30% (w/v) сахарозы – 3 мл, 20% (w/v) сахарозы – 3 мл. Затем настилали до верха пробирки 1–1,5 мл содержащего НВс-частицы лизата из штамма JM109/pQE60-НВс. Пробирки центрифугировали 22 ч при 15°C в роторе SW40 Ti на ультрацентрифуге Optima L-90K («Beckman Coulter», США) при 36 000 об/мин. После центрифугирования отбирали опалесцирующую фракцию, содержащую НВс-частицы.

#### Рефолдинг белков HA2-НВс/М2ек и НВс in vitro

Для получения ВПЧ использовали препараты очищенного белка HA2-НВс/М2ек и НВс-частиц или их смеси в различных соотношениях. Концентрация белка при рефолдинге составляла 0,1 мг/мл. Для полной денатурации белков и восстановления дисульфидных связей проводили диализ против буфера, содержащего 50 мМ Tris HCl (pH 7,4), 6 М мочевины и 20 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола ( $\beta$ -МЕ), в течение 12–16 ч при 10°C. Следующий этап диализа выполняли в таком же буфере, но с концентрацией мочевины 4 М и без  $\beta$ -меркаптоэтанола. На третьем этапе (этап непосредственного рефолдинга) диализ проводили против буфера, содержащего глутатионовую редокс-систему: 50 мМ Tris HCl (pH 7,4), 2 М мочевины, 0,2 мМ oxidized glutathione (#2232C108, «Amresco», США) и 2 мМ reduced glutathione (#0251C491, «Amresco», США). Далее выполняли 2 стадии рефолдирующего диализа со ступенчатым понижением концентрации мочевины до 1 М и 0,5 М. На завершающем этапе проводили диализ против буфера, содержащего только 50 мМ Tris HCl (pH 7,4).

#### Атомно-силовая микроскопия

Структуру ВПЧ анализировали методом атомно-силовой

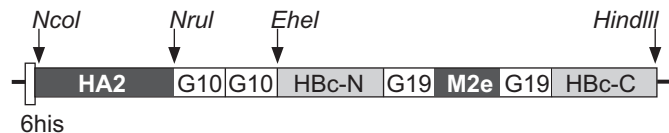


Рис. 1. Структура гена гибридного белка HA2-НВс/М2ек.

НВс-N и НВс-C – участки НВс-антигена до и после точки включения М2е в иммунодоминантную петлю; 6 his – последовательность, кодирующая N-концевой 6-гистициновый тег.

микроскопии с использованием микроскопа ИНТЕГРА Прима (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме.

## Результаты

### Дизайн и получение препаратов рекомбинантных белков

Консервативные антигены вируса гриппа, такие как М2е-пептид и стеблевой участок гемагглютинина, могут быть основой рекомбинантных противогриппозных вакцин широкого спектра действия. Поскольку включение в состав вакцины нескольких антигенов должно повысить её эффективность, мы получили гибридный белок HA2-НВс/М2ек, в котором к N-концу молекулы НВс-антигена была присоединена последовательность консервативного фрагмента второй субъединицы гемагглютинина HA2 [20], а в район иммунодоминантной петли включен М2е-пептид (рис. 1). Для обеспечения подвижности отдельных частей молекулы HA2-НВс/М2ек между фрагментом HA2 и НВс-антигеном были введены богатые глицином линкеры общей длиной 20 а.о., а М2е-пептид был фланкирован линкерами длиной 19 а.о. Чтобы избежать неконтролируемого

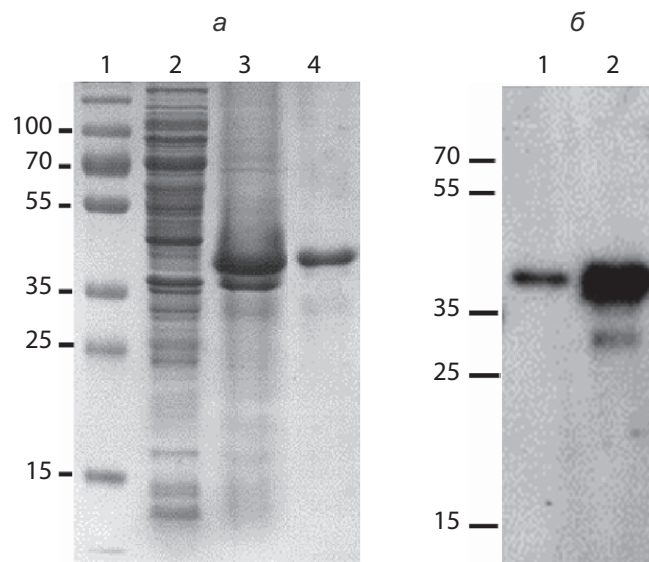


Рис. 2. Получение и очистка рекомбинантного белка HA2-НВс/М2ек.

а – результаты анализа белковых препаратов с помощью SDS-PAGE: 1 – маркер молекулярной массы (в кДа); 2 – белковый препарат из штамма-продуцента после индукции экспрессии HA2-НВс/М2ек, фракция растворимых белков клеточного лизата; 3 – то же, но фракция нерастворимых белков клеточного лизата; 4 – очищенный в денатурирующих условиях препарат рекомбинантного белка HA2-НВс/М2ек; б – вестерн-блот-анализ белковых препаратов: 1 – белковый препарат из штамма-продуцента после индукции экспрессии HA2-НВс/М2ек, фракция растворимых белков клеточного лизата; 2 – то же, но фракция нерастворимых белков клеточного лизата. Положения маркеров молекулярной массы (в кДа) указаны слева.

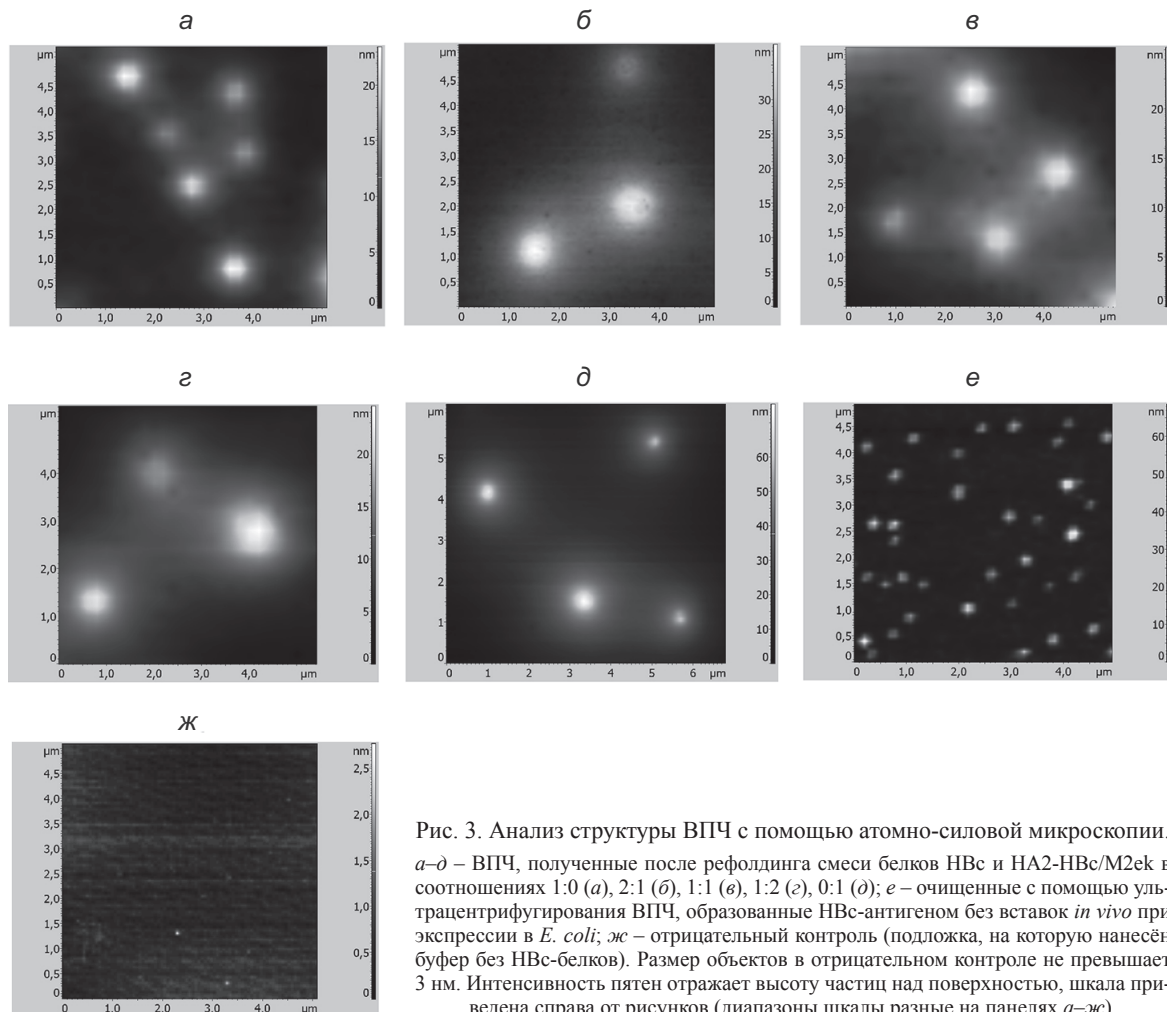


Рис. 3. Анализ структуры ВПЧ с помощью атомно-силовой микроскопии. *a-d* – ВПЧ, полученные после рефолдинга смеси белков НВс и НА2-НВс/М2ек в соотношениях 1:0 (*a*), 2:1 (*б*), 1:1 (*в*), 1:2 (*г*), 0:1 (*д*); *e* – очищенные с помощью ультрацентрифугирования ВПЧ, образованные НВс-антигеном без вставок *in vivo* при экспрессии в *E. coli*; *ж* – отрицательный контроль (подложка, на которую нанесён буфер без НВс-белков). Размер объектов в отрицательном контроле не превышает 3 нм. Интенсивность пятен отражает высоту частиц над поверхностью, шкала приведена справа от рисунков (диапазоны шкалы разные на панелях *a-ж*).

образования дисульфидных связей и как следствие агрегации рекомбинантного белка, в последовательности М2ек-пептида 2 цистеина в позициях 17 и 19 (считая от первого метионина в нативном М2) были заменены аминокислотными остатками серина. Такие замены не должны приводить к существенным изменениям иммунологических свойств М2е-пептида [22]. Кроме того, для предотвращения включения в полученные *in vivo* в *E. coli* НВс-частицы клеточной РНК, мы использовали укороченную последовательность НВс-антигена. Последовательность С-концевого фрагмента (после Val149), отвечающего за связывание с нуклеиновыми кислотами при сборке вириона, была удалена и заменена на цистеин, включение которого повышает стабильность НВс-частиц [23].

Полученный ген клонировали в векторе рЕТМ-10 под контролем промотора, узнаваемого Т7 РНК-полимеразой, при этом экспрессируемый рекомбинантный белок содержал полигистидиновый таг на N-конце. Этот белок был экспрессирован в штамме BL21(DE3) на высоком уровне, до 25–30% общего белка (рис. 2, *a*), и выявлялся антителами к М2е в вестерн-блоттинге (рис. 2, *б*). Однако анализ клеточных фракций показал, что практически весь белок НА2-НВс/М2ек находится в нерастворимой фракции. Изменение условий экспрессии (температура, концентрация ИППГ, время индукции) не позволило получить растворимый белок. Поэтому очистку рекомбинантного белка проводили в денатурирующих условиях с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-сорбенте (см. рис. 2, *a*).

Для получения НВс-антигена без вставок использовали век-

тор рQE60-НВс, обеспечивающий экспрессию укороченного НВс (с 4 по 149 а. о. и С-концевой цистеин), который образует ВПЧ *in vivo* в клетках штамма-продуцента [21]. Вирусоподобные НВс-частицы были очищены с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности цезий хлористый – сахароза. В дальнейшем их использовали как источник «немодифицированного» НВс.

*Получение мозаичных вирусоподобных НВ-частиц в результате рефолдинга in vitro*

Поскольку экспрессированный в *E. coli* белок НА2-НВс/М2ек оказался нерастворимым и его удалось выделить лишь в денатурирующих условиях, для получения ВПЧ проводили его рефолдинг через ступенчатый диализ совместно с белком НВс без чужеродных вставок. Изменение соотношения НВс и НА2-НВс/М2ек должно было обеспечить получение вирусоподобных НВс-частиц с различным числом представленных на них гриппозных эпитопов. С одной стороны, увеличение доли НВс без вставок должно облегчить формирование ВПЧ. С другой стороны, увеличение доли НА2-НВс/М2ек повышает вероятность встраивания этих молекул в формируемые ВПЧ и увеличивает число гриппозных эпитопов, представленных на их поверхности.

В связи с этим выполняли рефолдинг смеси очищенных и предварительно денатурированных препаратов НВс и НА2-НВс/М2ек в молярных соотношениях 1:0, 2:1, 1:1, 1:2 и 0:1. Рефолдинг белков проводили при общей концентрации целевого белка 0,1 мг/мл. После нескольких этапов диализа рефолдированные белки были переведены в 50 мМ Tris буфер

с рН 7,4, при этом все белковые препараты оставались растворимыми.

Наличие в полученных препаратах ВПЧ и их свойства исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии. В качестве контроля использовали препарат немодифицированных НВс-частиц, полученных *in vivo* и очищенных путём ультрацентрифугирования. Результаты атомно-силовой микроскопии показывают, что для всех препаратов наблюдаются округлые частицы размером от 25 до 50 нм. Наличие ВПЧ детектировали как в препаратах, содержащих НА2-НВс/М2ек совместно с немодифицированным НВс-антигеном (мозаичные частицы), так и в препаратах, содержащих только белки НА2-НВс/М2ек (рис. 3). Наблюдаемые размеры собранных *in vitro* НВс-частиц во всех случаях были несколько больше, чем у полученных *in vivo* в *E. coli*.

В дальнейшем на лабораторных животных будет исследована иммуногенность полученных таким образом ВПЧ – носителей М2е- и НА2-пептидов, а также протективное действие при заражении различными штаммами вируса гриппа А.

### Обсуждение

Целью данной работы было получение вирусоподобных НВс-частиц, несущих одновременно консервативные пептиды М2е и НА2 вируса гриппа. Хотя НВс-антиген широко используется как носитель чужеродных эпитопов [2], во многих случаях, в частности при включении гидрофобных или слишком длинных пептидов, белок оказывался нерастворимым и/или неспособным образовывать ВПЧ [2]. Включения в район иммунодоминантной петли НВс-антигена особенно чувствительны к вставке, поскольку в этом случае важна конформация включённого пептида, а именно возможность пространственного сближения N- и C-концов вставки. Частично эта проблема может быть решена за счёт фланкирования вставки гибкими богатыми глицином линкерами, что позволяет включить в этот участок даже несколько копий М2е-пептида [16]. Поскольку используемый нами в качестве антигена фрагмент НА2 содержит гидрофобный участок с 83 по 97 аминокислотами (FLDVWTY-NAELLVLM), последовательность НА2 включили на N-конец НВс-антигена, отделив его от последовательности НВс гибким линкером, а М2е-пептид включили в иммунодоминантную петлю. Соответствующий гибридный белок НА2-НВс/М2ек, хорошо экспрессировался в *E. coli*, но оказался нерастворимым, что не позволило получить ВПЧ. Поскольку аналогичный белок без НА2 растворим и образует ВПЧ при экспрессии в *E. coli* [16], вероятно, именно гидрофобный участок в НА2 нарушает растворимость гибридного белка.

Поэтому для получения ВПЧ из НА2-НВс/М2ек был использован метод рефолдинга *in vitro* совместно со способным образовывать ВПЧ немодифицированным НВс-антигеном. Чем больше доля немодифицированного НВс, тем легче должны образовываться мозаичные частицы. Несмотря на нерастворимость НА2-НВс/М2ек при экспрессии в *E. coli*, после рефолдинга он оказался растворимым и способным образовывать ВПЧ даже в отсутствие немодифицированного НВс-антигена. По-видимому, ступенчатый рефолдинг первоначально полностью денатурированного белка обеспечил его правильный фолдинг и сборку частиц.

Метод рефолдинга *in vitro* более сложен по сравнению с выделением ВПЧ, полученных в результате самосборки *in vivo* в *E. coli*, но он имеет и ряд преимуществ. Во-первых, полученные в *E. coli* частицы включают бактериальные компоненты, в частности клеточную РНК [11]. Во-вторых, сборка *in vitro* позволит создавать мозаичные частицы, несущие различные целевые эпитопы за счёт использования сочетания соответствующих модифицированных НВс-белков. Это может оказаться особенно полезным при создании противогриппозных вакцин на основе М2е, поскольку последовательность этого пептида практически неизменна у абсолютного большинства вирусов гриппа А человека, но отличается у вирусов гриппа

птиц и пандемического штамма А(Н1N1)2009, причём эти отличия важны для специфичности вакцин [24, 25]. Включение различных комбинаций иммунодоминантных эпитопов вируса гриппа, присоединённых к НВс-антигену, в состав мозаичной ВПЧ откроет возможность создания вакцин с более широким спектром защиты.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-00976).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ulrich R., Nassal M., Meisel H., Krüger D. H. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv. Virus Res.* 1998; 50: 141-82.
- Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology.* 2001; 44(2-3): 98-114.
- Crowther R.A., Kiselev N.A., Bottcher B., Berriman J.A., Borisova G.P., Ose V., et al. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell.* 1994; 77(6): 943-50.
- Bottcher B., Wynne S.A., Crowther R.A. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature.* 1997; 386(6620): 88-91.
- Wynne S.A., Crowther R.A., Leslie A.G. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell.* 1999; 3(6): 771-80.
- Kratz P.A., Bottcher B., Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(5): 1915-20.
- Vogel M., Diez M., Eisfeld J., Nassal M. In vitro assembly of mosaic hepatitis B virus capsid-like particles (CLPs): rescue into CLPs of assembly-deficient core protein fusions and FRET-suited CLPs. *FEBS Lett.* 2005; 579(23): 5211-6.
- Robinson C.R., Sauer R.T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(11): 5929-34.
- Kazaks A., Borisova G., Cvetkova S., Kovalevska L., Ose V., Sominskaya I., et al. Mosaic hepatitis B virus core particles presenting the complete preS sequence of the viral envelope on their surface. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 9): 2665-70.
- Koletzki D., Zankl A., Gelderblom H.R., Meisel H., Dislers A., Borisova G., et al. Mosaic hepatitis B virus core particles allow insertion of extended foreign protein segments. *J. Gen. Virol.* 1997; 78 (Pt. 8): 2049-53.
- Hatton T., Zhou S., Standing D.N. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J. Virol.* 1992; 66(9): 5232-41.
- Neirynck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.* 1999; 5(10): 1157-63.
- Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine.* 2009; 27(45): 6280-3.
- Ito T., Gorman O.T., Kawaoka Y., Bean W.J., Webster R.G. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J. Virol.* 1991; 65(10): 5491-8.
- Feng J., Zhang M., Mozdanzowska K., Zharikova D., Hoff H., Wunner W., et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virology.* 2006; 3: 102.
- Ravin N.V., Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Shaldjan A.A., Kovaleva A.A., et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective efficacy. *Vaccine.* 2015; 33(29): 3392-7.
- Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kuprianov V.V., Blokhina E.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine.* 2015; 33(29): 3398-406.
- Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44): 18979-84.
- Zhang H., Wang L., Compans R.W., Wang B.Z. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses.* 2014; 6(5): 1974-91.
- Stepanova L.A., Sergeeva M.V., Shuklina M.A., Shaldzhyan A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., et al. A fusion protein based on the second

- subunit of hemagglutinin of influenza A/H2N2 viruses provides cross immunity. *Acta Naturae*. 2016; 8(2): 116-26.
21. Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HBc-virus-like particles. *Virology*. 2013; 435(2): 293-300.
  22. De Filette M., Min Jou W., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., et al. Uni-versal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*. 2005; 337(1): 149-61.
  23. Riedl P., Stober D., Oehninger C., Melber K., Reimann J., Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace-amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J. Immunol.* 2002; 168(10): 4951-9.
  24. Kotlyarov R.Y., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., et al. Development of Recombinant Vaccine Against A(H1N1) 2009 Influenza Based on Virus-like Nanoparticles Carrying the Extracellular Domain of M2 Protein. *Acta Naturae*. 2010; 2(2): 71-7.
  25. De Filette M., Fiers W., Martens W., Birkett A., Ramne A., Löwenadler B., et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine*. 2006; 24(44-46): 6597-601.

Поступила 20.11.17

Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.891.083.2

*Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Леонов И.К.*

## КИНЕТИКА ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА УТЯТ ТИПА I (AVIHEPATOVIRU, PICORNAVIRIDAE)

Вероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал ФГБНУ Федерального научного центра «Вероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, 198412, г. Санкт-Петербург – Ломоносов

**Представлены экспериментальные данные кинетики инактивации вакцинного штамма вируса гепатита утят типа I повышенной температурой и аминоэтилэтиленимином (АЭЭИ). Показано, что вакцинный штамм 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I оказался сравнительно термостабильным при 56°C и чувствительным к действию АЭЭИ, время полной инактивации вируса составляет 24 ч в конечной концентрации 0,1% при 37 °C. Полученные результаты позволяют утверждать, что АЭЭИ можно использовать в качестве инактиватора при изготовлении инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I.**

**Ключевые слова:** кинетика инактивации; вирус гепатита утят; температура; формальдегид.

**Для цитирования:** Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Леонов И.К. Кинетика инактивации вируса гепатита утят типа I (Avihepatovirus, Picornaviridae). *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 135-138. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-135-138>

*Trefilov B.B., Nikitina N.V., Leonov I.K.*

## THE KINETICS OF THE INACTIVATION OF THE HEPATITIS VIRUS TYPE I (AVIHEPATOVIRUS, PICORNAVIRIDAE)

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science, Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute", St. Petersburg - Lomonosov, 198412, Russian Federation

**Experimental data on the kinetics of the inactivation of the vaccine strain of the duckling hepatitis virus of the type I with increased temperature and aminoethyl ethylenimine are presented. It was shown that the vaccine strain 3M-UNIP of the hepatitis virus of ducklings of type I was comparatively thermostable at 56°C and sensitive to the action of aminoethyl ethylenimine; the time of complete inactivation of the virus at a final concentration of 0.1% at 37°C was 24 h. The obtained results suggest that aminoethyl ethylenimine can be used as an inactivator in manufacturing inactivated vaccine against viral hepatitis of ducklings of type I.**

**Key words:** kinetics of inactivation; hepatitis virus of ducklings; temperature; formaldehyde.

**For citation:** Trefilov B.B., Nikitina N.V., Leonov I.K. The kinetics of the inactivation of the hepatitis virus type I (Avihepatovirus, Picornaviridae). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3):135-138. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-135-138>

**For correspondence:** Boris B. Trefilov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Chief Researcher of the Department of Virology and Tumor Bird Diseases named after R.N. Korovin, All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science, Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute", St. Petersburg - Lomonosov, 198412, Russian Federation. E-mail: [boris.trefilov@yandex.ru](mailto:boris.trefilov@yandex.ru)

### **Information about authors:**

Trefilov B.B., <http://orcid.org/0000-0002-4721-6955>

Nikitina N.V., <http://orcid.org/0000-0002-7500-3172>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 24 October 2017

Accepted 12 December 2017

**Для корреспонденции:** Борис Борисович Трефилов, д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц им. Р.Н. Коровина ВНИВИП, 198412, г. Санкт-Петербург – Ломоносов. E-mail: [boris.trefilov@yandex.ru](mailto:boris.trefilov@yandex.ru)