

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Получение вирусоподобных частиц норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*)

Новиков Д.В.¹, Мелентьев Д.А.^{1,2}, Мохонов В.В.¹, Кашников А.Ю.¹, Новикова Н.А.¹,
Лапин В.А.^{1,2}, Мохонова Е.В.¹, Новиков В.В.^{1,2}

¹ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, Нижний Новгород, Россия;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 603950, Нижний Новгород, Россия

Введение. Энтеровирусная (неполио) инфекция имеет широкое распространение во всём мире, регистрируется в форме спорадической заболеваемости и масштабных вспышек и может быть причиной такого тяжёлого поражения, как серозный менингит. Эпидемиологические исследования показали, что на территории Российской Федерации у больных энтеровирусным менингитом наиболее часто выявляется вариант энтеровируса (ЭВ) (*Picornaviridae: Enterovirus*) Echovirus 30 (E30). Однако вакцины для профилактики заболевания, вызванного этим возбудителем, до настоящего времени не разработаны. Одним из перспективных современных направлений в плане создания вакцинных препаратов является использование вирусоподобных частиц (ВпЧ), в т.ч. химерных – содержащих биологические структуры вирусов, принадлежащих к различным видам. **Цель** настоящей работы – получение ВпЧ норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих на своей поверхности белок VP1 E30.

Материал и методы. В работе использовали нуклеотидные последовательности генов белков VP1 норовируса генотипа GII.4 и VP1 вируса E30 генотипа h, циркулирующих на территории России. На их основе сконструирован белок S_N-VP1_{E30}, в котором оболочечный (S) и шарнирный (hinge) регионы VP1 норовируса слиты в одну молекулу с полноразмерным VP1 E30. Данный белок экспрессировали в *E. coli*, очищали методом аффинной хроматографии, после чего характеризовали с использованием электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинга. ВпЧ визуализировали методом электронной микроскопии.

Результаты. Белок S_N-VP1_{E30} экспрессировался в *E. coli* в нерастворимой форме. Подбор условий для получения его растворимой формы показал, что использование высоких концентраций сахарозы существенно повышает эффективность ренатурации. При сравнении электрофоретической подвижности денатурированного и неденатурированного препаратов S_N-VP1_{E30} установлено, что большинство мономеров образуют соединения со значительной молекулярной массой. С помощью электронной микроскопии показано, что ренатурированный белок S_N-VP1_{E30} самопроизвольно формирует *in vitro* полые ВпЧ диаметром ~50 нм.

Заключение. Показана возможность получения *in vitro* химерных ВпЧ норовируса, содержащих на своей поверхности белок VP1 циркулирующего на территории РФ варианта E30. Полученные частицы в дальнейшем могут быть использованы в разработке вакцинных препаратов для профилактики серозного менингита и других заболеваний, вызванных данным ЭВ.

Ключевые слова: вирусоподобные частицы; белок VP1 норовируса; белок VP1 энтеровируса Echovirus 30; химерные белки; вакцины

Для цитирования: Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А., Мохонова Е.В., Новиков В.В. Получение вирусоподобных частиц норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 383-389. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

Для корреспонденции: Новиков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, Нижний Новгород, Россия. E-mail: novikov.dv75@mail.ru

Участие авторов: Новиков Д.В. – проведение экспериментальных работ, написание текста статьи; Мелентьев Д.А. – проведение экспериментальных работ; Мохонов В.В. – проведение экспериментальных работ; Кашников А.Ю. – проведение экспериментальных работ; Новикова Н.А. – проведение экспериментальных работ, написание текста статьи; Лапин В.А. – проведение экспериментальных работ; Мохонова Е.В. – проведение экспериментальных работ; Новиков В.В. – проведение экспериментальных работ, написание текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.08.2021
Принята в печать 07.10.2021
Опубликована 31.10.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

Construction of norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*)

Dmitry V. Novikov¹, Dmitriy A. Melentev^{1,2}, Vladislav V. Mokhonov¹, Alexander Yu. Kashnikov¹, Nadezhda A. Novikova¹, Vladislav A. Lapin^{1,2}, Ekaterina V. Mokhonova¹, Viktor V. Novikov^{1,2}

¹FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia;

²FSAEI HE «National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod» of the Ministry of Education and Science of Russia, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

Introduction. Enterovirus (nonpolio) infection is widespread all over the world, registered as sporadic cases and large-scale outbreaks and can cause severe lesions such as serous meningitis. Epidemiological studies have shown that enterovirus (*Picornaviridae: Enterovirus*) variant Echovirus 30 (E30) is the most frequently detected variant in patients with enterovirus meningitis in the Russian Federation. However, no vaccines to prevent the disease caused by this pathogen have been developed so far. One of the promising modern trends in terms of creating vaccine preparations is the use of virus-like particles (VLPs), including chimeric ones containing the biological structures of viruses belonging to different species.

The aim of this work was to obtain norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) VLPs displaying enterovirus Echovirus E30 full-length VP1 on the surface.

Material and methods. The nucleotide sequences of VP1 protein of norovirus genotype GII.4 and VP1 E30 of genotype h circulating in Russia were used. The S_N-VP1_{E30} protein was constructed, in which the shell (S) and the hinge regions of the norovirus VP1 are fused into one molecule with the full-length VP1 of the E30 virus. The protein was expressed in *E. coli*, purified using affinity chromatography, and characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting. VLPs were visualized by electron microscopy.

Results. The S_N-VP1_{E30} protein expressed in *E. coli* as insoluble form, so the conditions for S_N-VP1_{E30} solubilisation were defined. Sucrose has been shown to significantly increase the efficiency of renaturation. Electrophoretic mobility comparison of denatured and non-denatured S_N-VP1_{E30} demonstrated that most monomers form high molecular weight compounds. Electron microscopy showed that renatured S_N-VP1_{E30} spontaneously forms empty virus-like particles about 50 nm in diameter.

Conclusion. Chimeric protein S_N-VP1_{E30} self-assemble into VLPs displaying the VP1 protein of E30 variant that is highly prevalent in Russia. Further immunological research is necessary to characterize VLPs potential for development of the vaccine for enteroviral meningitis prevention.

Key words: virus-like particles; norovirus VP1 protein; Echovirus 30 VP1 protein; chimeric proteins; vaccines

For citation: Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A., Lapin V.A., Mokhonova E.V., Novikov V.V. Construction of norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 383-389 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

For correspondence: Dmitry V. Novikov, Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Lead Researcher of the Immunochemistry Laboratory, FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: novikov.dv75@mail.ru

Information about the authors:

Novikov D.V., <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

Melentev D.A., <https://orcid.org/0000-0002-2441-6874>

Mokhonov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8542-5723>

Kashnikov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-1033-7347>

Novikova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Lapin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-5905-5722>

Mokhonova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-9742-7646>

Novikov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

Contribution: Novikov D.V. – performing the experiments, writing of the text; Melentev D.A. – performing the experiments; Mokhonov V.V. – performing the experiments; Kashnikov A.Yu. – performing the experiments; Novikova N.A. – performing the experiments, writing of the text; Lapin V.A. – performing the experiments; Mokhonova E.V. – performing the experiments; V.V. Novikov – performing the experiments, writing of the text.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Received 27 August 2021
Accepted 07 October 2021
Published 31 October 2021

Введение

Энтеровирусы (ЭВ) (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*, порядок *Picornavirales*) – многочисленная группа безоболочечных РНК-содержащих вирусов, циркуляция которых показана во всём мире [1]. Неполиомиелитные ЭВ способны вызывать различные по клинической картине и степени тяжести заболевания преимущественно у детей первых лет жизни. Энтеровирусная инфекция может проявляться в форме экзантемы полости рта и конечностей (hand, foot and mouth disease, HFMD), герпангины, менингита, менингоэнцефалита, энцефалита, полинейропатии, вялого паралича, миокардита и др. Тяжесть течения болезни варьирует от умеренного ухудшения самочувствия с субфебрильным повышением температуры тела до мультисистемных проявлений с поражением сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. Часто ЭВ имеют эпидемическое распространение, охватывающее большие группы детского населения [2].

На основе генетических характеристик и антигенных свойств ЭВ разделены на 4 вида (А–D), среди которых наиболее распространены вирусы, относящиеся к видам *Enterovirus A* (ЭВ-А) и *Enterovirus B* (ЭВ-В) [3]. Из них ЭВ-А (*Enterovirus A71*; *Coxsackievirus A6*, *A10*, *A16* и др.) наиболее часто вызывают HFMD у детей младшего возраста. Подавляющее большинство заболевших полностью выздоравливают через 7–10 сут. Однако в некоторых случаях развиваются выраженные осложнения, вызванные поражением центральной нервной системы; описаны единичные летальные исходы. Представители вида ЭВ-В (*Coxsackievirus B3*, *B5*; *Echovirus 25*, *30*) чаще связаны с такими серьёзными заболеваниями, как миокардит, асептический менингит, энцефалит и гепатит, нередко приводящими к инвалидности или смерти [4]. В этой группе особо выделяются вирусы ЕСНО (*англ.* enteric cytopathic human orphan viruses, букв. – кишечные цитопатогенные человеческие орфанные вирусы), поскольку они являются причиной асептического менингита и энцефалита не только у детей, но и у взрослых [5].

ЭВ регистрируются повсеместно, однако в странах Юго-Восточной Азии наибольшее эпидемическое значение имеют ЭВ-А, а в государствах, расположенных на территориях Европы и Северной Америки, – ЭВ-В [6, 7]. Эпидемиологические исследования распространённости ЭВ на территории Российской Федерации показали, что в последнее время у детей и взрослых, больных энтеровирусным менингитом, наиболее часто выявляется *Echovirus 30* (E30) [8].

В мировой практике с целью профилактики энтеровирусной инфекции разрабатываются вакцины главным образом для предотвращения экзантемных поражений, вызванных *Enterovirus A71*, *Coxsackievirus A6*, *A10*, *A16*. В отношении ЭВ-В подобные разработ-

ки направлены на *Coxsackievirus B3*, являющийся основной причиной миокардита [9]. В то же время в мире и в России часто регистрируются эпидемические подъёмы заболеваемости, обусловленные вариантом E30 [10], однако вакцина для профилактики вызываемых им заболеваний отсутствует.

Ранее была предложена универсальная платформа на основе белка VP1 норовируса (*Caliciviridae*; *Norovirus*) для презентации вирусных антигенов (АГ). Такой подход позволяет получать вирусоподобные частицы (ВпЧ), на поверхности которых представлены различные АГ, пригодные для использования в составе вакцинных препаратов. Показано, что полученные в *E. coli* белки, состоящие из аминокислотной последовательности S-домена VP1, слитого в одну молекулу с фрагментами аналогичных последовательностей VP8 ротавируса (*Reoviridae*; *Sedoreovirinae*: *Rotavirus*), гемагглютинина вируса гриппа А (*Orthomyxoviridae*: *Influenza A virus*) (H7N9) или капсидного белка вируса гепатита Е (*Hepeviridae*; *Hepevirus*: *Hepatitis E virus*), способны формировать ВпЧ, имеющие на своей поверхности добавленные пептиды. Иммунизация лабораторных животных химерными структурами, созданными согласно данному принципу, приводила к продукции нейтрализующих антител в высоких титрах [11, 12]. Цель настоящей работы – получение ВпЧ норовируса, содержащих на поверхности белок VP1 E30.

Материал и методы

Конструирование слитого белка. В работе использовали нуклеотидные последовательности генов белков VP1 норовируса генотипа GI.4 (GenBank No. MZ958411) и VP1 E30 генотипа h (GenBank No. KP090772), штаммов, циркулирующих на территории РФ. Конструирование слитого гена проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей с использованием пакета программ Lasergene (Dnastar, Inc., США). Оптимизацию кодонов осуществляли на основе информации, представленной в базе данных Codon usage database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). ДНК синтезировали в ООО «Люмипроб РУС» (Россия) и клонировали в составе плазмиды pET22b (Novagen, США).

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка. Для экспрессии рекомбинантного белка использовали штамм *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Novagen, США), клетки которой трансформировали плазмидой, кодирующей рекомбинантный белок, с применением мультипоратора Eppendorf (Германия). *E. coli* выращивали при 37 °С в среде LB (lysogeny broth) (1% триптон, 2% дрожжевой экстракт, 0,9% NaCl и 100 мкг/мл ампициллина) до оптической плотности 0,7. Экспрессию индуцировали добавлени-

ем изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 0,5 мМ, после чего культуру инкубировали на протяжении 6 ч при 30 °С. Клетки осаждали низкоскоростным центрифугированием, однократно отмывали в 0,9% NaCl и лизировали с использованием реагента BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, США) согласно рекомендациям производителя. Лизат разделяли центрифугированием при 12 000 g в течение 15 мин на растворимую и осадочную белковые фракции. Последнюю с целью очистки рекомбинантного белка растворяли в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl, 6 М гуанидина гидрохлорида, 150 мМ NaCl (pH 7,5), и затем выполняли аффинную хроматографию с использованием сорбента IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Швеция) согласно рекомендациям производителя для денатурирующих условий. Ренатурацию белка осуществляли методом диализа против 3000 объёмов буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl и 20%, 10% или 5% сахарозы (C₁₂H₂₂O₁₁).

Определение концентрации белка. Концентрацию белка в растворе определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, США) при длине волны 280 нм. Эффективность ренатурации белка оценивали путём сравнения концентрации растворимого белка до и после диализа. Значение концентрации до диализа принимали за 100%.

Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг. Все этапы экспрессии и очистки рекомбинантного белка контролировали методом электрофореза белков в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Денатурацию белков проводили в течение 5 мин при 100 °С в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 6,8), 100 мМ дитиотреитола, 2% ДСН и 4 М мочевины. При исследовании олигомерного состояния белки наносили на гель в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 6,8), 2% ДСН и 20% глицерина. Результаты визуализировали окрашиванием геля с помощью красителя Coomassie brilliant blue R-250 (Imperial Chemical Industries PLC, Великобритания). Использовали маркер молекулярных масс Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder (10 to 200 kDa) (ThermoFisher Scientific). Интенсивность окрашивания белковых полос оценивали при помощи компьютерной программы C-DiGit (LI-COR, США). Для проведения иммуноблоттинга белки переносили из геля на мембрану из поливинилиденфторида (ПВДФ; PVDF) (ThermoFisher Scientific) посредством системы влажного переноса (Bio-Rad, США). Контроль переноса и определения молекулярной массы осуществляли с использованием маркера PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific), представляющего собой смесь 9 белков (от 10 до 250 кДа), окрашенных синим, оранжевым и зелёным. Мембрану блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BCA; BSA) в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline, PBS) и инкубировали с антителами anti-His-HRP:GG1-6F4.3.2 (Miltenyi Biotec, США). После этого мембрану окрашивали в растворе субстрата SuperSignal West

Dura Extended Duration Substrate kit (ThermoFisher Scientific) и измеряли хемилюминесценцию при помощи сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR), также в соответствии с рекомендациями производителей.

Электронная микроскопия. В экспериментах использовали трансмиссионную электронную микроскопию. На электронно-микроскопическую медную сетку, покрытую парлодиевой плёнкой, нанесли 5 мкл раствора белка в концентрации 100 мкг/мл, отмывали водой от несвязавшихся компонентов и окрашивали водным раствором 2% уранилацетата (pH 4,5). Образцы просматривали с помощью электронного микроскопа просвечивающего типа HT7700 (Hitachi, Япония).

Результаты

На основе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих белки VP1 норовируса генотипа GI.4 и VP1 вируса E30 генотипа h, создана генетическая конструкция S_N-VP1_{E30}, состоящая из слитых в одну молекулу последовательностей, кодирующих оболочечный (S) и шарнирный (hinge) регионы VP1 норовируса, полноразмерный белок VP1 E30 и последовательности, кодирующей 6 молекул гистидина (His, H). Структурная организация слитого белка S_N-VP1_{E30} схематически показана на **рис. 1**. Для более эффективного образования ВпЧ триплеты, кодирующие аминокислоты в позициях 57, 58 и 136 S-региона VP1 норовируса, заменены на нуклеотиды, кодирующие цистеин (Cys, C), как предложено ранее [11]. Нуклеотидная последовательность оптимизирована для экспрессии в *E. coli* и помещена под контроль регуляторных элементов бактериофага T7 в составе плазмиды pET22b.

Результаты экспрессии белка S_N-VP1_{E30} в *E. coli* представлены на **рис. 2**. После индукции в *E. coli* нарабатывался дополнительный белок (**рис. 2, а**). Методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител против последовательности из 6 молекул гистидина подтверждена экспрессия S_N-VP1_{E30} (**рис. 2, б**). При сравнении набора белков *E. coli* в растворимой и осадочной фракциях установлено, что S_N-VP1_{E30} присутствовал в нерастворимой форме (**рис. 2, в**). В связи с этим осадочную белковую фракцию растворяли в буфере, содержащем 6 М гуанидина гидрохлорида, и выделяли S_N-VP1_{E30}, содержащий гистидиновый «хвост», методом аффинной хроматографии. Электрофоретическая подвижность очищенного искомого белка совпадала с расчётной (**рис. 2, г**).

Для ренатурации белка S_N-VP1_{E30} использовали предложенный ранее метод стабилизации ВпЧ норовируса. J. Kissmann и соавт. показали, что высокие концентрации различных сахаров оказывают стабилизирующий эффект на вторичную и третичную структуру мономеров ВпЧ этого вируса [13]. В нашем исследовании наблюдался сходный эффект высоких концентраций сахаров по отношению к белку S_N-VP1_{E30}. Диализ против содержащего 20% сахарозы буферного раствора позволил ренатурировать до 97% количества S_N-VP1_{E30} (**рис. 3**).

Ренатурированный в 20% сахарозе препарат исследовали на способность мономеров S_N -VP1_{E30} к образованию межмолекулярных связей. Сравнение электрофоретической подвижности денатурированного и неденатурированного препаратов исследуемого белка показало, что большинство мономерных структур образуют соединения со значительной молекулярной массой, детектируемые в начале геля (рис. 4, а). Способность мономеров S_N -VP1_{E30} формировать ВпЧ изучали методом электронной микроскопии, при проведении которой в препарате белка обнаружены сферические ВпЧ размером ~50 нм. Данные частицы были окрашены изнутри (рис. 4, б),

что характерно для полых образований. Полученные результаты свидетельствуют о способности химерной белковой структуры, состоящей из S-фрагмента VP1 норовируса и полноразмерного белка VP1 энтеровируса E30, к самосборке.

Обсуждение

Несмотря на широкое распространение вируса E30 и его доказанную связь с возникновением энтеровирусного менингита и других заболеваний, данный вирус является одним из наименее изученных представителей ЭВ. Основные представления о строении их вириона и жизненном цикле получены на примере

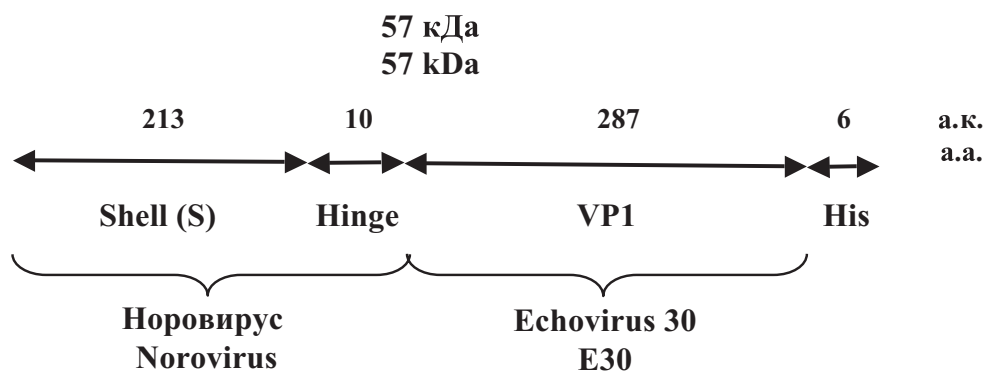


Рис. 1. Схема организации слитого белка S_N -VP1_{E30}.

Shell (S) – аминокислотный домен белка VP1 норовируса; Hinge – шарнирный регион VP1 норовируса; VP1 – полноразмерный белок VP1 вируса E30; His – последовательность из 6 гистидинов.

Fig. 1. Scheme of the fusion protein.

Shell (S), norovirus VP1 amino-terminal domain; Hinge, norovirus VP1 hinge region; VP1, E30 virus full-length VP1 protein; His, sequence of six six histidines.

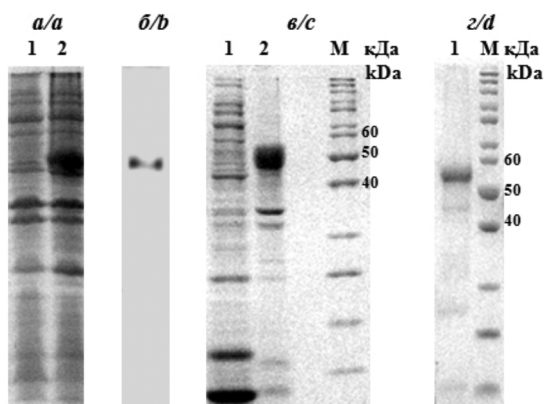


Рис. 2. Экспрессия белка S_N -VP1_{E30} в *E. coli*.

а) – сравнение белков *E. coli* до (1) и через 6 ч после (2) индукции экспрессии; б) – подтверждение экспрессии белка S_N -VP1_{E30} иммуноблоттингом; в) – состав белков *E. coli* в растворимой (1) и нерастворимой (2) фракциях; г) – электрофоретическая подвижность очищенного S_N -VP1_{E30} (1); М – маркеры молекулярной массы.

Fig. 2. Expression of S_N -VP1_{E30} protein in *E. coli*.

а), comparison of *E. coli* proteins before (1) and 6 hours after induction of expression (2); б), confirmation of S_N -VP1_{E30} protein expression by immunoblotting; в), *E. coli* protein composition in soluble (1) and insoluble (2) fractions; г), electrophoretic mobility of purified S_N -VP1_{E30} (1); М, molecular weight markers.



Рис. 3. Зависимость эффективности ренатурации белка S_N -VP1_{E30} от концентрации сахарозы.

Fig. 3. The efficiency of S_N -VP1_{E30} protein renaturation depending on the sucrose concentration.

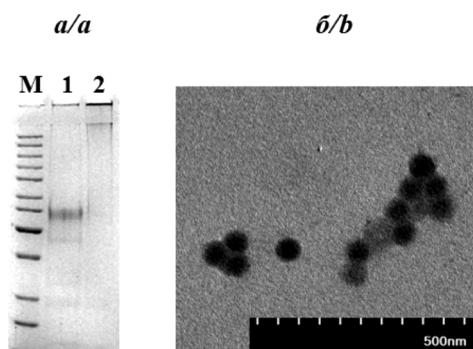


Рис. 4. Самосборка белка S_N -VP1_{E30}.

a) – сравнение электрофоретической подвижности денатурированного (1) и неденатурированного (2) S_N -VP1_{E30}; б) – вирусоподобные частицы, образованные белком S_N -VP1_{E30}; электронная микрофотография, увеличение $\times 12\,000$.

Fig. 4. Self-assembly of the S_N -VP1_{E30} protein.

a), comparison of the electrophoretic mobility of denatured (1) and non-denatured (2) S_N -VP1_{E30}; b), virus-like particles formed by the S_N -VP1_{E30} protein; electron microphotograph, 12,000 \times magnification.

Enterovirus A71, Coxsackievirus A16 и A6. К настоящему времени известно, что основной капсидный белок VP1 этих вирусов формирует поверхностные структуры вириона, отвечающие за распознавание рецептора на клетке. На поверхности VP1 ЭВ обнаружены как конформационные, так и линейные нейтрализующие эпитопы, что делает данный белок основным кандидатом для разработки типоспецифических вакцин [14].

Поскольку основной группой риска заболеваний, вызванных ЭВ, являются дети младшего возраста, разработка безопасных вакцинных препаратов на основе пептидов, содержащих нейтрализующие эпитопные последовательности, считается привлекательным и многообещающим подходом. Однако по сравнению с вакцинами на основе убитых или аттенуированных вирусов небольшие синтетические пептиды обладают слабой иммуногенностью [15]. В то же время ВпЧ имеют морфологию вириона и являются оптимальными системами доставки, обеспечивающими презентацию нейтрализующих эпитопов иммунной системе. Обладая способностью эффективно взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками, указанные частицы максимизируют иммуногенный потенциал и защитные свойства антител [16].

На сегодняшний день разработано множество подходов использования ВпЧ в качестве векторов для презентации АГ [12, 17, 18]. Нами сконструированы химерные ВпЧ, построенные на основе белка капсида норовируса. Выбор данной модели связан со способностью норовирусных ВпЧ вызывать сильный иммунный ответ на слизистой оболочке, что даёт перспективу для разработки эффективной мукозальной вакцины [19]. Путём генетических манипуляций в белке VP1 норовируса представленный на поверхности вириона Р-домен (англ. protruding – выступающий) заменён на полноразмерный VP1 вируса E30. Поскольку поверхностные белки вириона ЭВ не гли-

козируются, экспрессия рекомбинантного белка осуществлялась в клетках *E. coli*. Полученный слитый белок использован для сборки ВпЧ *in vitro*.

Стратегия получения подобных частиц ЭВ *in vivo* в клетках насекомых (*Insecta*) или дрожжей (*Ascomycota*, *Basidiomycota*) для последующего использования в качестве АГ в составе вакцин описана для Enterovirus A71, вируса Coxsackievirus A16 и Enterovirus D68 [20, 21]. При использовании такого подхода капсидные белки собираются в ВпЧ внутри клеток-хозяев. Это приводит к инкапсулированию внутрь ВпЧ ассоциированных с клеткой-хозяином загрязнений, потенциально способных вызвать нежелательный иммунный ответ, в т.ч. аллергические реакции [22]. В нашей работе показана возможность самосборки *in vitro* химерных ВпЧ, презентующих на своей поверхности VP1 E30. Для сборки используется очищенный белок, что препятствует встраиванию в частицу нежелательных примесей. Кроме этого, методология сборки *in vitro* предоставляет возможность смешивать в составе частицы различные белки, что в перспективе позволит получать ВпЧ, содержащие АГ от разных генотипов E30 либо смесь белков ЭВ разных типов в одной частице. Апробированная в данной работе методика создания химерных ВпЧ на основе платформы из капсидного белка норовируса открывает возможности разработки поливалентной энтеровирусной вакцины, а также быстрой замены АГ в случае появления новых эпидемических вариантов ЭВ.

Заключение

В настоящей работе получены ВпЧ, состоящие из химерной рекомбинантной белковой структуры, включающей слитые с полноразмерным белком VP1 энтеровируса E30 S-домен и шарнирную часть белка VP1 норовируса. Поскольку поверхностные белки вириона ЭВ не гликозируются, для наработки рекомбинантного белка применена одна из самых простых и недорогих систем экспрессии – *E. coli*. Использование способности химерного белка к самосборке в условиях *in vitro* открывает перспективы формирования ВпЧ, содержащих АГ от разных генотипов вируса E30 или смесь белков ЭВ разных типов. Последующее изучение свойств сконструированных химерных ВпЧ позволит оценить их потенциал в качестве возможного прототипа вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses*. 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
2. Mao Q., Wang Y., Bian L., Xu M., Liang Z. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases. *Emerg. Microbes Infect.* 2016; 5(7): e75. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.73>
3. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(10): 2421–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
4. Xu W., Liu C., Yan L., Li J., Wang L., Qi Y., et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications. *Virol. J.* 2012; 9: 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-8>
5. Kupila L., Vuorinen T., Vainionpaa R., Hukkanen V., Marttila R.J., Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in

- an adult population. *Neurology*. 2006; 66(1): 75–80. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000191407.81333.00>
6. Chang L.Y., Lin H.Y., Gau S.S., Lu C.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., et al. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae. *J. Biomed. Sci.* 2019; 26(1): 57. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0552-7>
 7. Abedi G.R., Watson J.T., Pham H., Nix W.A., Oberste M.S., Gerber S.I. Enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2009–2013. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2015; 64(34): 940–3. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6434a3>
 8. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Селиванова С.Г., Пономарёва Н.В., Кашников А.Ю., Созонов Д.В., и др. Этиологическая структура энтеровирусных инфекций в Российской Федерации в 2017–2018 гг. *Здоровье населения и среда обитания*. 2019; (8): 30–8. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38>
 9. He X., Zhang M., Zhao C., Zheng P., Zhang X., Xu J. From monovalent to multivalent vaccines, the exploration for potential preventive strategies against hand, foot, and mouth disease (HFMD). *Viol. Sin.* 2021; 36(2): 167–75. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00294-3>
 10. Lema C., Torres C., Van der Sanden S., Cisterna D., Freire M.C., Gomez R.M., et al. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*. 2019; 531: 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
 11. Xia M., Huang P., Sun C., Han L., Vago F.S., Li K., et al. Bioengineered norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform. *ACS Nano*. 2018; 12(11): 10665–82. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02776>
 12. Tan M., Huang P., Xia M., Fang P.A., Zhong W., McNeal M., et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J. Virol.* 2011; 85(2): 753–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01835-10>
 13. Kissmann J., Ausar S.F., Foubert T.R., Brock J., Switzer M.H., Detzi E.J., et al. Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(10): 4208–18. <https://doi.org/10.1002/jps.21315>
 14. Yuan J., Shen L., Wu J., Zou X., Gu J., Chen J., et al. Enterovirus A71 proteins: Structure and function. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
 15. Dudek N.L., Perlmutter P., Aguilar M.I., Croft N.P., Purcell A.W. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16(28): 3149–57. <https://doi.org/10.2174/138161210793292447>
 16. Mohsen M.O., Gomes A.C., Vogel M., Bachmann M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*. 2018; 6(3): 37. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030037>
 17. Anggraeni M.R., Connors N.K., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Middelberg A.P. Sensitivity of immune response quality to influenza helix 190 antigen structure displayed on a modular virus-like particle. *Vaccine*. 2013; 31(40): 4428–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.087>
 18. Rivera-Hernandez T., Hartas J., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Good M., et al. Self-adjuvanting modular virus-like particles for mucosal vaccination against group A streptococcus (GAS). *Vaccine*. 2013; 31(15): 1950–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.013>
 19. Tacket C.O., Sztein M.B., Losonsky G.A., Wasserman S.S., Estes M.K. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin. Immunol.* 2003; 108(3): 241–7. [https://doi.org/10.1016/s1521-6616\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/s1521-6616(03)00120-7)
 20. Zhao H., Li H.Y., Han J.F., Deng Y.Q., Zhu S.Y., Li X.F., et al. Novel recombinant chimeric virus-like particle is immunogenic and protective against both enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in mice. *Sci. Rep.* 2015; 5: 7878. <https://doi.org/10.1038/srep07878>
 21. Zhang C., Zhang X., Zhang W., Dai W., Xie J., Ye L., et al. Enterovirus D68 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris* potently induce neutralizing antibody responses and confer protection against lethal viral infection in mice. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0005-x>
 22. Le D.T., Müller K.M. In vitro assembly of virus-like particles and their applications. *Life (Basel)*. 2021; 11(4): 334. <https://doi.org/10.3390/life11040334>
 1. Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses*. 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
 2. Mao Q., Wang Y., Bian L., Xu M., Liang Z. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases. *Emerg. Microbes Infect.* 2016; 5(7): e75. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.73>
 3. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(10): 2421–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
 4. Xu W., Liu C., Yan L., Li J., Wang L., Qi Y., et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications. *Viol. J.* 2012; 9: 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-8>
 5. Kupila L., Vuorinen T., Vainionpää R., Hukkanen V., Marttila R.J., Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*. 2006; 66(1): 75–80. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000191407.81333.00>
 6. Chang L.Y., Lin H.Y., Gau S.S., Lu C.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., et al. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae. *J. Biomed. Sci.* 2019; 26(1): 57. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0552-7>
 7. Abedi G.R., Watson J.T., Pham H., Nix W.A., Oberste M.S., Gerber S.I. Enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2009–2013. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2015; 64(34): 940–3. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6434a3>
 8. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Selivanova S.G., Ponomareva N.V., Kashnikov A.Yu., Sozonov D.V., et al. Etiological structure of enterovirus infection in the Russian Federation in 2017–2018 [Этиологическая структура энтеровирусных инфекций в Российской Федерации в 2017–2018 гг.]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2019; (8): 30–8. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38> (in Russian)
 9. He X., Zhang M., Zhao C., Zheng P., Zhang X., Xu J. From monovalent to multivalent vaccines, the exploration for potential preventive strategies against hand, foot, and mouth disease (HFMD). *Viol. Sin.* 2021; 36(2): 167–75. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00294-3>
 10. Lema C., Torres C., Van der Sanden S., Cisterna D., Freire M.C., Gomez R.M., et al. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*. 2019; 531: 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
 11. Xia M., Huang P., Sun C., Han L., Vago F.S., Li K., et al. Bioengineered norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform. *ACS Nano*. 2018; 12(11): 10665–82. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02776>
 12. Tan M., Huang P., Xia M., Fang P.A., Zhong W., McNeal M., et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J. Virol.* 2011; 85(2): 753–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01835-10>
 13. Kissmann J., Ausar S.F., Foubert T.R., Brock J., Switzer M.H., Detzi E.J., et al. Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(10): 4208–18. <https://doi.org/10.1002/jps.21315>
 14. Yuan J., Shen L., Wu J., Zou X., Gu J., Chen J., et al. Enterovirus A71 proteins: Structure and function. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
 15. Dudek N.L., Perlmutter P., Aguilar M.I., Croft N.P., Purcell A.W. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16(28): 3149–57. <https://doi.org/10.2174/138161210793292447>
 16. Mohsen M.O., Gomes A.C., Vogel M., Bachmann M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*. 2018; 6(3): 37. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030037>
 17. Anggraeni M.R., Connors N.K., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Middelberg A.P. Sensitivity of immune response quality to influenza helix 190 antigen structure displayed on a modular virus-like particle. *Vaccine*. 2013; 31(40): 4428–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.087>
 18. Rivera-Hernandez T., Hartas J., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Good M., et al. Self-adjuvanting modular virus-like particles for mucosal vaccination against group A streptococcus (GAS). *Vaccine*. 2013; 31(15): 1950–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.013>
 19. Tacket C.O., Sztein M.B., Losonsky G.A., Wasserman S.S., Estes M.K. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin. Immunol.* 2003; 108(3): 241–7. [https://doi.org/10.1016/s1521-6616\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/s1521-6616(03)00120-7)
 20. Zhao H., Li H.Y., Han J.F., Deng Y.Q., Zhu S.Y., Li X.F., et al. Novel recombinant chimeric virus-like particle is immunogenic and protective against both enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in mice. *Sci. Rep.* 2015; 5: 7878. <https://doi.org/10.1038/srep07878>
 21. Zhang C., Zhang X., Zhang W., Dai W., Xie J., Ye L., et al. Enterovirus D68 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris* potently induce neutralizing antibody responses and confer protection against lethal viral infection in mice. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0005-x>
 22. Le D.T., Müller K.M. In vitro assembly of virus-like particles and their applications. *Life (Basel)*. 2021; 11(4): 334. <https://doi.org/10.3390/life11040334>

REFERENCES