

УДК 577.112

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ Е6 И Е7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА: ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА, ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА *in vivo*

© 2021 г. М. Е. Субботина^{1,2,*}, Т. М. Грунина^{1,2}, О. В. Сергиенко², Н. В. Елкина³, Д. С. Елкин³, М. В. Новикова³, П. Б. Копнин³, С. В. Винокурова³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119121 Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии”, Москва, 127550 Россия

³Научно-исследовательский институт канцерогенеза, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

*e-mail: subbotinam@gmail.com

Поступила в редакцию 09.11.2020 г.

После доработки 04.12.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Синтезом в гетерологичной системе экспрессии в *Escherichia coli* получены препараты рекомбинантных белков Е6-СВД и Е7-СВД, представляющих собой антигены Е6 и Е7 вируса папилломы человека высокоонкогенного 16 типа (ВПЧ16), соединенные с помощью глицин-серинового спейсера с целлюлозосвязывающим доменом (СВД) из *Anaerocellum thermophilum*. Разработана простая и эффективная одностадийная технология выделения и очистки рекомбинантных белков Е6-СВД и Е7-СВД. Наличие антигенных свойств у полученных белковых препаратов подтверждено методом вестерн-блоттинга. Разработаны три варианта иммуногенных композиций с рекомбинантными белками Е6-СВД, Е7-СВД и схема 3-этапной иммунизации, проведена оценка иммуногенности на мышах линии BALB/c, изучен противоопухолевый эффект иммуногенных композиций на экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ16-ассоциированными опухолями. Показано, что Е6-СВД и Е7-СВД являются высокоиммуногенными и обладают противоопухолевым эффектом *in vivo*. Для достижения наибольшей эффективности в составе иммуногенной композиции необходимо присутствие обоих белков Е6-СВД и Е7-СВД. Полученные рекомбинантные антигены Е6-СВД и Е7-СВД ВПЧ16 могут использоваться в двух направлениях: 1) в клинической практике – в качестве основных специфических компонентов терапевтических вакцин для лечения ВПЧ16-ассоциированных неопластических поражений различных локализаций (рак шейки матки, карциномы аногенитального тракта, ротоглотки); 2) в диагностике – при разработке диагностических наборов для выявления антител к онкобелкам Е6 и Е7 у пациентов с ВПЧ16-ассоциированными злокачественными новообразованиями.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, онкогенные белки Е6 и Е7, рак шейки матки, терапевтические вакцины, иммуногенность, противоопухолевый эффект

DOI: 10.31857/S0555109921030120

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) представляют собой семейство двухцепочечных кольцевых ДНК-содержащих вирусов, которые являются интраэпителиальными патогенами и вызывают развитие как доброкачественных, так и злокачественных новообразований (рак шейки матки (РШМ), рак аногенитальной области, носоглотки, головы и шеи) [1, 2]. За развитие более 80% всех цервикальных карцином ответственны ВПЧ высокоонкогенных типов 16 и 18 [3, 4]. Основной путь передачи ВПЧ – половой, но возможны также вертикальный (от инфицированной матери плоду) и гори-

зонтальные пути передачи вируса, в том числе контактно-бытовой [5, 6]. На ранних стадиях ВПЧ-инфекция зачастую протекает бессимптомно, неспецифические клинические признаки появляются лишь на поздних стадиях, что затрудняет выявление и проведение своевременного лечения ВПЧ-ассоциированных онкологических заболеваний.

При ВПЧ-инфекции основную роль в имortalизации, злокачественной трансформации клеток и поддержании их трансформированного фенотипа играют онкобелки Е6 и Е7 ВПЧ [7]. Они облада-

ют высокой консервативностью, конститутивной экспрессией в опухолевых и предраковых клетках и не вызывают развитие аутоиммунных реакций, поскольку являются чужеродными белками для человека. Благодаря перечисленным свойствам белки Е6 и Е7 ВПЧ являются наиболее перспективными мишенями для создания терапевтических вакцин против ВПЧ-индуцированных онкологических заболеваний [1, 8].

На сегодняшний день ни одна из терапевтических вакцин против ВПЧ не одобрена авторитетными организациями (FDA, ВОЗ) к использованию в клинической практике. Рекомендованы к применению лишь профилактические вакцины: квадριвалентная и нонавалентная вакцины Gardasil® (“Merck Sharp&Dohme Corp.”, США) и бивалентная вакцина Cervarix® (“GlaxoSmithKline Biologicals”, Бельгия), направленные на формирование ВПЧ-нейтрализующих антител. В России вакцинация против ВПЧ не входит в национальный календарь профилактических прививок. К сожалению, успешность профилактической вакцинации определяется отсутствием или наличием инфицированности ВПЧ: у индивидов, которые были инфицированы ВПЧ до проведения вакцинации, профилактические вакцины не могут предотвратить развитие неопластических изменений и рака, а также вертикальную и горизонтальную передачу вируса от инфицированных родителей детям [9]. Таким образом, существенная доля населения не защищена от ВПЧ-инфекций, поэтому разработка терапевтических вакцин для стимуляции цитотоксического Т-клеточного ответа, направленного на уничтожение ВПЧ-инфицированных и малигнизированных клеток, представляется крайне актуальной.

В настоящее время ряд кандидатных терапевтических вакцинных композиций, предназначенных для лечения ВПЧ-ассоциированных предраковых поражений и опухолевых заболеваний, в том числе РШМ, проходит доклинические и клинические испытания [10]. В основном в состав иммуногенных композиций входит онкобелок Е7, так как он лучше охарактеризован в доклинических исследованиях [11]. Однако онкобелок Е6 не менее перспективен – в экспериментах Накагава с соавт. [12] излечение от ВПЧ-инфекции коррелировало с цитотоксическим Т-клеточным ответом, индуцированным онкобелком Е6.

Помимо терапевтического применения, мишени Е6 и Е7 могут также использоваться в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний: пациентки с РШМ имеют более высокие уровни анти-Е6- и анти-Е7-антител, чем женщины с нормальной цитологической картиной или низкой степенью тяжести дисплазии шейки матки [13].

Одним из наиболее простых способов получения рекомбинантных антигенов в больших коли-

чествах с целью разработки иммуногенных композиций является клонирование гена в прокариотический экспрессионный вектор и получение белка в *Escherichia coli*. Показано, что рекомбинантный белок Е7, полученный микробиологическим синтезом, сохраняет антигенные свойства нативного белка, распознаваемого сыворотками от ВПЧ-инфицированных субъектов, и поэтому он используется в серологических исследованиях. Получение белка Е7 в растворимой форме не представляет собой значительную сложность [14–16]. Напротив, белок Е6 имеет тенденцию образовывать тельца включения при экспрессии в *E. coli*, по всей видимости, из-за наличия в его составе сильных гидрофобных аминокислотных остатков [17]. Было предложено несколько подходов для преодоления проблем получения рекомбинантного Е6, однако его гидрофобные свойства сохранялись даже при соединении с глутатион-S-трансферазой или мальтозосвязывающим белком, что приводило к частичной агрегации белка [18, 19]. В работе [20] проведена успешная очистка белка Е6 двухступенчатым хроматографическим методом, однако он был стабильным только в щелочной среде (рН 10), что значительно ограничивает его применение [20]. Таким образом, актуальной задачей являлось получение в *E. coli* онкобелков Е6 и Е7 в растворимой форме, сохраняющих стабильность при нейтральных рН.

Цель работы – получение рекомбинантных антигенов Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа в гетерологичной системе экспрессии в *Escherichia coli*, очистка, изучение их иммуногенности и противоопухолевой активности *in vivo* на мышцах линии BALB/c.

МЕТОДИКА

Получение плазмидных конструкций, кодирующих антигены Е6 и Е7 ВПЧ16. Нуклеотидные последовательности синтетических генов, кодирующих белки Е6 (GenBank: AYV61474.1) и Е7 (GenBank: AYV61475.1) ВПЧ 16 типа (**ВПЧ16**), оптимизировали с учетом кодонного состава *E. coli* и отсутствия выраженной вторичной структуры мРНК и фланкировали сайтами NcoI и Kpn2I на 5'- и 3'-концах соответственно. Оптимизацию кодонного состава синтетических генов проводили с помощью программы JCat (<http://www.jcat.de/>), корректировку вторичной структуры транскрибируемой РНК – с помощью веб-сервера DINAMelt (http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two_state_folding).

Синтез генов проведен фирмой “Евроген” (Россия).

Синтетические гены, кодирующие белки Е6 и Е7 ВПЧ16, встраивали по сайтам NcoI и Kpn2I в плазмиду pR1504 (на основе рекомбинантного вектора pQE-6, “Qiagen”, США) под промотором

фага Т7. Полученными генно-инженерными конструкциями трансформировали штамм *E. coli* М15 методом электропорации с использованием аппарата MicroPulser ("Bio-Rad", США). Отбор клонов проводили с использованием антибиотиков — ампициллина (150 мкг/мл) и канамицина (20 мкг/мл). Отобранные клоны культивировали в препаративных количествах, выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее в 1%-ном агарозном геле согласно общепринятым методикам [21]. Размеры полученных продуктов соответствовали расчетным значениям. Правильность нуклеотидных последовательностей клонированных генов подтверждали секвенированием.

Получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков Е6 и Е7 ВПЧ16, содержащих целлюлозосвязывающий домен. Далее гены, кодирующие белки Е6 и Е7, встраивали по сайтам рестрикции BamHI, BglI и BglII в экспрессионные векторы рТТ10 (на основе плазмиды рQE-6) и рL650 (на основе плазмиды рR1504) соответственно, содержащие последовательность гена целлюлозосвязывающего домена (CBD, cellulose binding domain) из *Anaerocellum thermophilum* и глицин-серинный спейсер. Полученными плазмидами трансформировали штаммы *E. coli* BL21 [pRep4] и М15 [pRep4] методом электропорации.

Выращивание клеток-продуцентов белков Е6-CBD и Е7-CBD. Культуры трансформированных клеток выращивали в среде LB с добавлением канамицина (20 мг/л) и ампициллина (150 мг/л) при 37°C на ротационной качалке Multitron Standard ("Infors HT", Швейцария) при 180 об./мин до достижения ОП₆₀₀ 0.8–1.0. Синтез белка индуцировали добавлением 0.5 мМ раствора ИПТГ, далее культуру выращивали в течение 6–7 ч при 25°C и центрифугировали в течение 15 мин при 5697 g и 4°C. Биомассу хранили при –20°C.

Выделение и очистка рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD. Размороженную биомассу бактериальных клеток суспендировали в лизирующем буфере (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl, 0.5%-ный Тритон Х100, 0.1 мМ фенолметилсульфонилфторид), добавляя его в соотношении не менее чем 1 : 10 (вес/об.), вносили 100 мкг/мл лизоцима, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, обрабатывали на ультразвуковой установке Vibra-Cell ("Sonics", США; 40%-ная амплитуда, дважды по 2 мин на льду) и выдерживали еще в течение 15–20 мин на льду. Смесь центрифугировали при 19650 g в течение 30 мин при 4°C. В супернатанте содержались растворимые клеточные белки в правильной нативной конформации, а белки нерастворимой фракции (в том числе тельца включения) — в осадке. Для дальнейшей очистки белков Е6-CBD и Е7-CBD использовали супернатант.

Используемый метод очистки рекомбинантных белков основан на способности химерных белков с целлюлозосвязывающим доменом специфически связываться с целлюлозосодержащим сорбентом — Perloza MT500. Супернатант, полученный после лизиса 1 г биомассы клеток штамма-продуцента, инкубировали с равным объемом густой суспензии сорбента Perloza MT500 ("Perloza", Чехия), приготовленной в буфере (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl, 0.1%-ный Тритон Х100), в течение не менее 3 ч. Суспензию перенесли в хроматографическую колонку и промывали сорбент с иммобилизованным на нем белком 10-кратным объемом того же буфера до падения и стабилизации сигнала УФ-детектора. Затем колонку отмывали от Тритона Х-100 10-кратным объемом буфера (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 500 мМ NaCl) до падения и стабилизации сигнала УФ-детектора. В связи с сильной адсорбцией CBD-содержащих белков на матрице целлюлозосодержащего сорбента, элюцию целевых белков проводили 6 М раствором мочевины в 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0. Рефолдинг очищенных белков осуществляли диализом путем понижения концентрации мочевины: 1 сут против 4 М мочевины, фосфатный буфер (рН 7.4), затем против 2.0 М мочевины в том же буфере (рН 7.4), далее 1 сут против фосфатного буфера (рН 7.4) без мочевины при температуре 4°C.

Полученные пробы целевых белков на разных стадиях очистки анализировали методом электрофореза в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС по Лэммли. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда.

Стерилизующая фильтрация. Стерилизующую фильтрацию полученных растворов белков проводили продавливанием через мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0.22 мкм (однофазная стерильная система "Corning", США) в стерильном боксе. Количественные потери при фильтрации оценивали, измеряя оптическую плотность растворов белков при 280 нм.

Полученные после стерилизации растворы белков Е6-CBD и Е7-CBD переносили в стерильные полипропиленовые пробирки, замораживали и хранили при –20°C.

Изучение стабильности рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD при хранении. Для изучения стабильности образцы рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD (10 мкг белка в 0.25 мл стерильного фосфатного буфера, рН 7.4, в стерильных флаконах) были заложены в трехкратной повторности на хранение при +4°C (рекомендуемая температура хранения препаратов белков). Из замороженных на хранение образцов рекомбинантных белков отбирали пробы в течение 3 месяцев с интервалом в 7 дней. Оценку стабильности полученных проб рекомбинантных белков прово-

дили с помощью электрофоретического анализа в 12%-ном ПААГ по стандартной методике с целью выявления признаков деградации белков.

Вестерн-блоттинг. В работе использовали ВПЧ16-положительные клеточные линии карцином шейки матки SiHa (ATCC HTB-35™) и Ca Ski (ATCC CRL-1550™). Клетки культивировали в среде DMEM с L-глутамином, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, антибиотики пенициллин (50 ед./мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

Для приготовления клеточных лизатов использовали RIPA-буфер (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 150 мМ NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% ДДС, 1 мМ ортованадат натрия, 1 мМ NaF) с ингибитором протеаз cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (“Roche”, Германия). Концентрацию белков измеряли с использованием ВСА-метода Pierce™ ВСА Protein Assay Kit, “Thermo Scientific”, США). Для разделения белков в 7%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na использовали 40 мкг белка клеточных линий SiHa и Ca Ski и 0.5 мкг рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD. Белки смешивали с буфером для нанесения проб по Лэммли (4% ДДС, 10% β-меркаптоэтанол, 20% глицерина, 0.004% бромфенолового синего, 0.125 М Трис-НСl, рН 6.8) и инкубировали 5 мин при 95°C. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL 0.45 мкм (“GE Healthcare/Life Sciences”, США) осуществляли методом полусухого переноса с использованием катодного (6 мМ Трис, 4 мМ N-циклогексил-3-аминопропансульфокислота (N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS), 40%-ный этиловый спирт) и анодного буферов (6 мМ Трис, 4 мМ CAPS, 10%-ный ДДС). Перенос проводили с использованием прибора Trans-Blot Turbo Transfer System (“Bio-Rad”, США) в течение 20 мин при постоянном напряжении 25 В и переменном токе до 1 А. Мембрану блокировали в 5%-ном обезжиренном молоке на TBST-буфере (20 мМ Трис, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Твин 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами мыши к белку E6 ВПЧ16 в титре 1 : 200 (sc-460, “Santa Cruz Biotechnology”, США), а к белку E7 ВПЧ16 в титре 1 : 500 (sc-65711, “Santa Cruz Biotechnology”, США) проводили при 4°C в течение ночи. Инкубацию со вторичными антителами козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена, в титре 1 : 5000 (“Bio-Rad”, США) проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Проявляли с использованием субстрата Clarity™ Western ECL Substrate (“Bio-Rad”, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Создание иммуногенных композиций на основе рекомбинантных антигенов E6-CBD и E7-CBD. На основе полученных рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD были разработаны три варианта иммуногенных композиций, состоящие из одного или двух рекомбинантных антигенов (производятся по независимым технологическим схемам), иммобилизованных на ДЭАЭ-декстрани одноцепочечных синтетических олигодезоксирибонуклеотидов CpG в качестве адьюванта и ДЭАЭ-декстрана. Состав иммуногенных композиций представлен в табл. 1.

Экспериментальные животные. В работе использовали самок мышей сингенной инбредной линии BALB/c в возрасте 7–8 нед. весом 18–20 г ($n = 60$, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России).

Исследование гуморального иммунного ответа. Интактным мышам линии BALB/c ($n = 10$, опытные группы) трехкратно вводили иммуногенную композицию CBD1 (табл. 1), содержащую рекомбинантные антигены E6-CBD и E7-CBD, с интервалом в 5 сут. Инъекцию производили однократным стерильным инсулиновым шприцом подкожно в холку животного. Объем раствора для введения составлял 150 мкл. Животным контрольной группы ($n = 10$) по описанной схеме вводили физиологический раствор. Иммунный ответ исследовали через 14 и 42 сут после последней инъекции иммуногенной композиции CBD1. В течение всего эксперимента проводили постоянный мониторинг физиологического состояния экспериментальных животных.

По истечении 14 и 42 сут с момента последней инъекции лабораторных животных опытных и контрольной групп вводили в ингаляционный наркоз и проводили сбор образцов крови из сердечной полости для определения титра антител в сыворотке крови. После сбора всех индивидуальных образцов крови в вакуумные пробирки их оставляли при комнатной температуре на 20 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 1500 g без охлаждения. Надосадочную жидкость переносили в 1.5-мл стерильные пробирки и замораживали при –80°C.

Для определения титра антител к специфическим компонентам вакцины (антигены E6 и E7 ВПЧ16) в сыворотке крови мышей использовали метод непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого белки E6-CBD и E7-CBD, разведенные в 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере до концентрации 1 мкг/мл, сорбировали в 96-луночном планшете (Costar® Assay Plate, “Corning Incorporated”, США) в количестве 100 нг белка на лунку в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее проводили блокировку с использованием Blocker™ Casein in PBS (“Thermo Scien-

Таблица 1. Состав одной дозы (объемом 150 мкл) испытуемых иммуногенных композиций

Название композиции	Описание	Основные компоненты
CBD1	Иммуногенная композиция с двумя рекомбинантными антигенами Е6-CBD и Е7-CBD	Е6-CBD – 33.1 мкг Е7-CBD – 41.2 мкг ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг СрG ODN – 30 мкг
CBD2	Иммуногенная композиция с одним рекомбинантным антигеном Е6-CBD	Е6-CBD – 33.1 мкг ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг СрG ODN – 30 мкг
CBD3	Иммуногенная композиция с одним рекомбинантным антигеном Е7-CBD	Е7-CBD – 41.2 мкг ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг СрG ODN – 30 мкг

tific”, США) в течение 1 ч при температуре 37°C. Затем добавляли 100 мкл сыворотки, разведенной в соотношении 1 : 100–1 : 1024000 в промывочном буфере PBST (фосфатно-солевой буфер, “ПанЭко”, Россия) с 0.05% твин-20, инкубировали 1 ч при 37°C. Для обнаружения антител, связанных с сорбированными антигенами, добавляли вторичные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (“ИМТЕК”, Россия), разведенные в PBST в соотношении 1 : 10000, инкубировали 1 ч при 37°C. Затем добавляли 100 мкл ТМБ-субстрата для пероксидазы хрена (“ИМТЕК”, Россия), инкубировали плашки при комнатной температуре 5–7 мин, затем останавливали реакцию добавлением 50 мкл 2 М серной кислоты. С помощью микропланшетного ридера Spectramax M5e (“Molecular Devices”, США) измеряли поглощение при длине волны 450 нм. Количественно титр определяли как предельное разведение сыворотки, при котором еще наблюдается регистрируемый данным методом положительный эффект взаимодействия антисыворотки с антигеном.

Экспериментальная модель мышей для оценки противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций. Для создания экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ16-ассоциированными злокачественными новообразованиями использовали модифицированную клеточную линию рака молочной железы мыши 4Т1 (ATCC CRL-2539TM) со стабильной экспрессией полноразмерных онкогенных белков Е6 и Е7 ВПЧ16 (далее – клетки 4Т1 Е6/Е7), которую получали путем трансфекции вектором, содержащим полноразмерные рамки считывания онкогенов Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа под контролем промотора цитомегаловируса (pCMV-Neo-Vam).

Мышам линии BALB/c ($n = 40$) в правый бок подкожно однократными инсулиновыми шприцами вводили суспензию 0.25×10^6 опухолевых клеток 4Т1 Е6/Е7 в физиологическом растворе

объемом 100 мкл. Начиная с 3 сут после инъекции, пальпацией ежедневно проверяли наличие сформированного опухолевого узелка. Измерения линейных параметров аутографтов, то есть “длины” и “ширины”, проводили с помощью электронного штангенциркуля через равные временные промежутки. Для удобства визуальной детекции, потенциального повышения точности измерений и дальнейшего извлечения аутографта аккуратно, не допуская повреждений кожного покрова, выбривали шерстяной покров в области сформированного аутографта электрической машинкой для стрижки волос.

Мониторинг физиологического состояния мышей проводили ежедневно в течение всего эксперимента. Особое внимание уделяли животным, имеющим нездоровый внешний вид (истощение, быстрая потеря более 30% массы тела, кахексия), поведенческим (потеря аппетита, физической активности) и физиологическим (нарушения дефекации и мочеиспускания, изменения слизистых оболочек и кожных покровов) аспектам их жизнедеятельности.

Исследование противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций. После формирования опухолевых узелков на 5-е сут после введения клеток 4Т1 Е6/Е7 мышам трех опытных групп ($n = 10$, группы CBD1–CBD3, табл. 1) была сделана первая инъекция иммуногенных композиций и далее – еще две инъекции соответствующих иммуногенных композиций с интервалом в 5 сут (трехэтапная иммунизация). Инъекции проводили однократным стерильным инсулиновым шприцом подкожно в холку животного. Объем раствора для введения составлял 150 мкл. Животным контрольной группы ($n = 10$) по описанной схеме вводили физиологический раствор.

Для оценки противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций проводили визуальный осмотр аутографтов, анализировали кривые роста, терминальный объем и вес аутографтов. Ви-

зуальный осмотр аутографтов осуществляли при каждом измерении их параметров на предмет наличия очагов некроза.

Анализ кривых роста аутографтов. По полученным в ходе эксперимента измерениям линейных параметров (“ширина” и “длина”) рассчитывали объем каждого аутографта по следующей формуле:

$$V_1 = \frac{a^2 b}{2}, \quad (1)$$

где a – “ширина”, b – “длина”, $a \leq b$. Далее строили график зависимости объема аутографтов от количества дней после инъекции клеток 4Т1 Е6/Е7 с учетом стандартных отклонений.

Анализ терминального объема и веса аутографтов. По окончании исследования мышей терминировали парами эфира. После извлечения аутографтов измеряли их третий линейный параметр – “высоту” (c). Для расчета терминального объема аутографтов использовали аппроксимированную формулу объема эллипсоида, поскольку данная пространственная фигура наиболее близка к форме подкожных аутографтов:

$$V_{эл} = \frac{4}{3} \pi abc,$$

где a , b , c – полуоси эллипсоида.

Аппроксимация:

$$V_2 = \frac{abc}{2}, \quad (2)$$

где a , b , c – “ширина”, “длина” и “высота” соответственно.

Аутографты взвешивали на электронных весах и строили гистограмму среднего веса терминальных аутографтов с учетом стандартных отклонений.

Противоопухолевый эффект иммуногенной композиции считали потенциально положительным при отсутствии пересечения пределов погрешностей кривых/столбцов, соответствующих опытным и контрольной группам. Анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение генно-инженерных конструкций и штаммов-продуцентов рекомбинантных белков Е6-СВD и Е7-СВD. На первом этапе работы были спланированы последовательности синтетических генов, кодирующих онкогенные белки Е6 и Е7 ВРС16. Нуклеотидные последовательности были оптимизированы за счет вырожденных позиций нуклеотидных остатков таким образом, чтобы в них по возможности присутствовали ко-

доны, наиболее часто встречающиеся в *E. coli*. Также была проведена корректировка вторичной структуры транскрибируемой мРНК с целью предупреждения образования шпилек и сложных элементов вторичной структуры, которые могут снижать эффективность трансляции. Последовательности генов фланкировали сайтами эндонуклеаз NcoI и KpnII на 5'- и 3'-концах соответственно для последующего клонирования с использованием плазмиды pR1504 на основе вектора pQE-6 в *E. coli* М15. Далее клонированные гены, кодирующие белки Е6 и Е7, встраивали по сайтам рестрикции BamHI, BglI и BglII в экспрессионные векторы на основе плазмиды pQE-6, содержащие последовательность гена СВD из термофильного микроорганизма *Anaerocellum thermophilum*, соединенные через глицин-сериновый спейсер. Полученными векторами трансформировали штаммы *E. coli* BL21 [pRep4] и М15 [pRep4].

Индукция экспрессии обоих рекомбинантных белков с помощью ИПТГ приводила к накоплению соответствующих продуктов ожидаемой молекулярной массы. Содержание белков Е6-СВD и Е7-СВD составляло 15%.

Выделение и очистка рекомбинантных белков Е6-СВD и Е7-СВD. Процедура выделения и очистки полученных в данной работе рекомбинантных белков Е6-СВD и Е7-СВD основана на способности специфически связываться с целлюлозосодержащим сорбентом Perloza MT500 за счет целлюлозосвязывающего домена, что позволяет проводить процедуру связывания и очистки рекомбинантных белков на твердой фазе в одну стадию. Важной особенностью является отсутствие у штаммов *E. coli* BL21 и М15 собственных белков, специфически взаимодействующих с целлюлозой.

Разработанная методика выделения и очистки рекомбинантных белков Е6-СВD и Е7-СВD из индуцированных клеток штаммов-продуцентов включает следующие стадии: осаждение клеток из культуральной среды центрифугированием, лизис и разрушение клеток посредством обработки лизоцимом и ультразвуком, разделение методом центрифугирования белков легкорастворимой фракции и нерастворимых белков, очистка рекомбинантных белков с помощью аффинной хроматографии на целлюлозосодержащем сорбенте, стерилизующая фильтрация.

Анализ фракций, полученных на первом этапе очистки, показал, что целевые рекомбинантные белки Е6-СВD и Е7-СВD находятся во фракции легкорастворимых белков и частично – во фракции нерастворимых белков (рис. 1 и 2, дорожки 1 и 2). Для дальнейшей очистки рекомбинантных белков Е6-СВD и Е7-СВD использовали супернатант (рис. 1 и 2, дорожки 1).

Результаты электрофоретического разделения в ПААГ по Лэммли разных фракций рекомби-

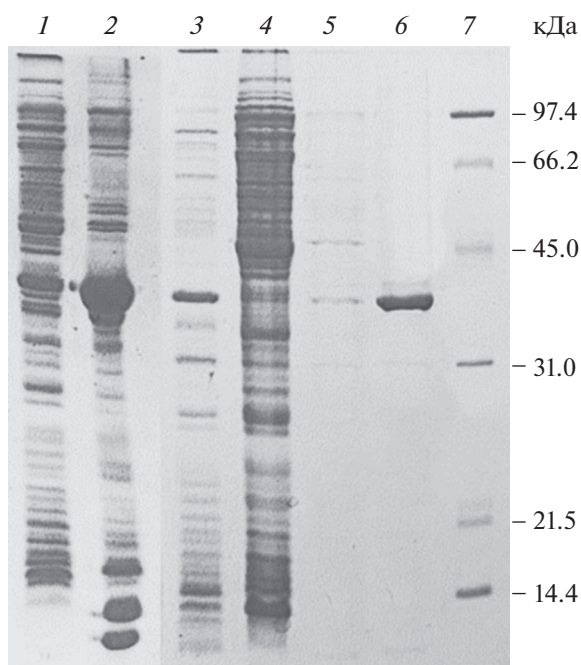


Рис. 1. Электрофореграмма разделения в 12%-ном ПААГ белковых фракций, полученных при очистке рекомбинантного белка Е6-СВD: 1 – супернатант после лизиса биомассы штамма-продуцента Е6-СВD; 2 – осадок после лизиса биомассы клеток штамма-продуцента Е6-СВD; 3 – белки супернатанта после лизиса биомассы, не связавшиеся с Perloza MT500; 4 – промывка 20 мМ Трис-НСl-буфером (рН 8.0) с 0.1% Тритона X100; 5 – промывка Трис-НСl-буфером (рН 8.0) без Тритона X100; 6 – рекомбинантный белок Е6-СВD (41.2 кДа), элюированный с сорбента 6 М мочевиной; 7 – белковые маркеры молекулярной массы.

нантных белков Е6-СВD (41.2 кДа) и Е7-СВD (33.1 кДа), полученных в процессе выделения и очистки, приведены на рис. 1 и 2. Очищенные белки представляли собой гомогенные препараты, молекулярные массы полученных белков соответствовали ожидаемым.

Выход рекомбинантных белков Е6-СВD и Е7-СВD после очистки по разработанной методике из 1 г биомассы клеток-продуцентов составил 4.5 мг для каждого из белков, степень очистки полученных рекомбинантных белков – не менее 95%. При изучении стабильности рекомбинантных белков было показано, что образцы обоих белков при хранении в течение трех месяцев при +4°C полностью сохраняли гомогенность и соответствие молекулярным массам, признаки деградации белков или протеолитического гидролиза отсутствовали (данные не приведены).

Таким образом, в результате разработанных схем клонирования, экспрессии, одностадийной очистки и рефолдинга были получены препараты рекомбинантных белков Е6-СВD и Е7-СВD. В основе использованного подхода лежит техноло-

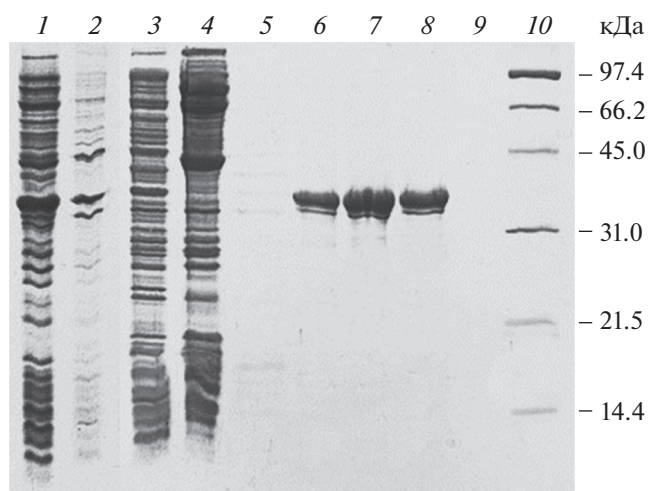


Рис. 2. Электрофореграмма разделения в 12%-ном ПААГ белковых фракций, полученных в процессе выделения и очистки рекомбинантного белка Е7-СВD: 1 – супернатант после лизиса биомассы штамма-продуцента Е7-СВD; 2 – осадок после лизиса биомассы клеток штамма-продуцента Е7-СВD; 3 – белки супернатанта после лизиса биомассы, не связавшиеся с Perloza MT500; 4 – промывка 20 мМ Трис-НСl-буфером (рН 8.0) с 0.1% Тритона X100; 5 – промывка Трис-НСl-буфером (рН 8.0) без Тритона X100; 6–8 – рекомбинантный белок Е7-СВD (33.1 кДа), элюированный с сорбента 6 М мочевиной; 10 – белковые маркеры молекулярной массы.

гия получения слитных белков с целлюлозосвязывающими доменами, успешно примененная ранее для клонирования, экспрессии и очистки различных белков [22–24]. Целлюлозосвязывающие домены позволяют проводить очистку белков на недорогих целлюлозосодержащих носителях, обеспечивают стабильность целевых белков, а также в ряде случаев позволяют повысить растворимость химерного белка по сравнению с исходным вариантом. В случае онкобелка Е7 ВПЧ16 был получен полностью растворимый белок Е7-СВD. Это не удивительно, учитывая накопленный ранее опыт других исследователей, получивших экспрессию растворимого белка Е7 при различных вариантах клонирования в клетках *E. coli* [16, 25, 26]. В случае онкобелка Е6 ВПЧ16 за счет присоединения СВD удалось получить химерный белок Е6-СВD частично в растворимой форме. Близкий результат описан в работе [20], в которой был получен химерный белок Е6, соединенный с глутатион-S-трансферазой, однако в физиологических условиях этот белок оказался нестабильным – выделить его удалось лишь в сильнощелочных условиях, что, безусловно, затруднит использование данного белка. Полученный рекомбинантный белок Е6-СВD, выделенный на целлюлозосодержащем сорбенте, характеризовался стабильностью при хранении при значениях рН, близких к нейтральным.

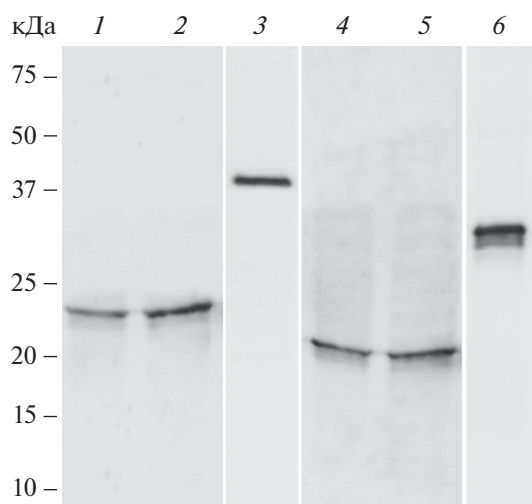


Рис. 3. Результаты вестерн-блоттинга, полученные с использованием коммерческих антител к антигенам Е6 (1–3) и Е7 ВПЧ16 (4–6), ВПЧ16-положительных клеточных линий карцином шейки матки SiHa (1, 4) и Ca Ski (2, 5), а также препаратов рекомбинантных белков Е6-CBD (3) и Е7-CBD (6).

Вестерн-блоттинг. С целью проверки сохранности иммунореактивных эпитопов у полученных рекомбинантных антигенов Е6-CBD и Е7-CBD после процедур выделения и очистки был проведен вестерн-блоттинг с использованием специфических коммерческих антител к белкам Е6 и Е7 ВПЧ16 и ВПЧ16-положительных клеточных линий карцином шейки матки SiHa и Ca Ski (АТСС, США).

Результаты вестерн-блоттинга представлены на рис. 3. Были выявлены полосы размером ~41.2 и ~33.1 кДа, что соответствовало теоретическим молекулярным массам рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD.

Таким образом, методом вестерн-блоттинга было подтверждено наличие антигенных свойств у обоих рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD.

Создание иммуногенных композиций на основе рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD. На основе полученных рекомбинантных антигенов Е6-CBD и Е7-CBD были разработаны три варианта иммуногенных композиций (табл. 1), в состав которых входят оба рекомбинантных антигена либо один антиген, а также дополнительный иммуномодулирующий компонент – иммобилизованные на ДЭАЭ-декстране СрG-олигонуклеотиды, используемые в качестве адъюванта для индукции цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа на опухолевые антигены.

Разработана схема трехэтапной иммунизации с подкожным введением иммуногенных компо-

зиций в объеме 150 мкл в холку животного с интервалом в 5 сут.

Оценка иммуногенности *in vivo* на мышях линии BALB/c. Опытным группам мышей линии BALB/c ($n = 10$) производили инъекции иммуногенной композиции CBD1 (табл. 1), содержащей рекомбинантные антигены Е6-CBD и Е7-CBD, трехкратно с интервалом в 5 сут. Животным контрольной группы ($n = 10$) по описанной схеме вводили физиологический раствор. Для потенциальной активации гуморального иммунного ответа мышей содержали в течение 14 и 42 сут после последней инъекции иммуногенной композиции CBD1. Затем животных терминировали, проводили забор крови и определяли титр антител в сыворотке крови методом непрямого ИФА.

Результаты исследования представлены на рис. 4. Титр специфических к Е6-CBD и Е7-CBD антител достигал значений ~1 : 128 000, который сохранялся на высоком уровне в течение 14 и 42 сут после последней инъекции иммуногенной композиции CBD1 (рис. 4а, 4б).

Таким образом, исследование гуморального иммунного ответа на трехкратное введение иммуногенной композиции CBD1 показало, что специфические компоненты иммуногенных композиций – рекомбинантные антигены Е6-CBD и Е7-CBD ВПЧ16 – являются высокоиммуногенными и вызывают повышение гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c *in vivo*. Высокий титр специфических антител к рекомбинантным антигенам Е6-CBD и Е7-CBD сохранялся как минимум в течение 42 сут.

Исследование противоопухолевого эффекта на модели мышей линии BALB/c с ВПЧ-16-ассоциированными опухолями. Противоопухолевый эффект трех вариантов иммуногенных композиций на основе рекомбинантных антигенов Е6-CBD и Е7-CBD (табл. 1) изучали *in vivo* с использованием созданной в данной работе экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ-ассоциированными опухолями, развитие которых было индуцировано подкожным введением модифицированных клеток рака молочной железы мыши 4Т1 (АТСС CRL-2539TM) со стабильной экспрессией полноразмерных онкобелков Е6 и Е7 ВПЧ16.

После формирования аутографтов (опухолевых узелков) (на 5-е сут после введения клеток 4Т1 Е6/Е7) мышам опытных групп ($n = 10$; группы CBD1–CBD3, табл. 1) была сделана первая инъекция иммуногенной композиции подкожно в холку и далее – еще две инъекции с интервалом в 5 сут (трехэтапная иммунизация). Животным контрольной группы ($n = 10$) по описанной схеме вводили физиологический раствор.

После каждой инъекции иммуногенных композиций у животных опытных групп наблюда-

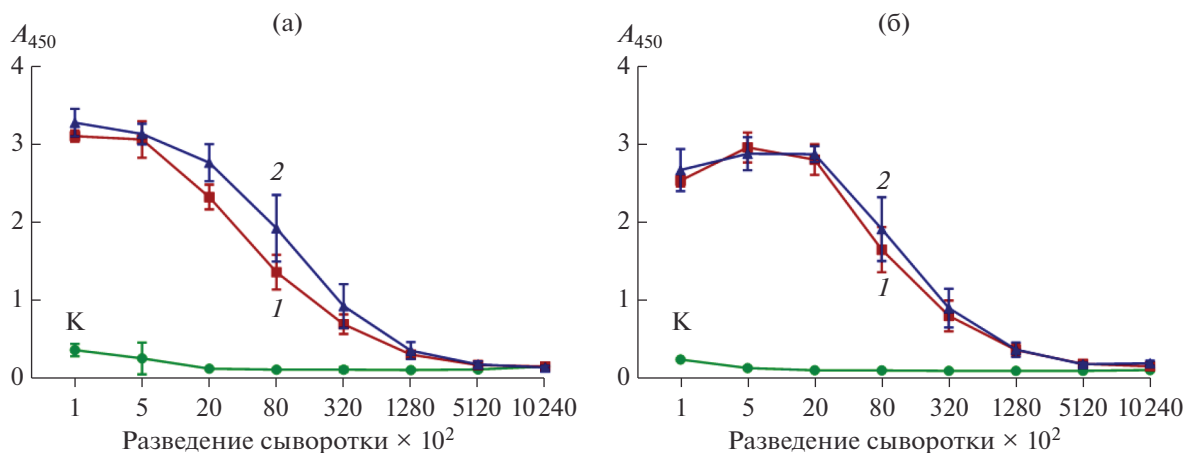


Рис. 4. Титр антител к рекомбинантным антигенам E6-CBD (а) и E7-CBD (б), наблюдаемый через 14 (1) и 42 (2) сут после трехкратного введения иммуногенной композиции CBD1 мышам линии BALB/c (состав CBD1 см. в табл. 1). К – контроль.

лось снижение активности и аппетита, длящееся не более суток, без нарушения прочих физиологических функций. По окончании иммунизации такие состояния больше не отмечались. На 21–24-е сут после инъекции опухолевых клеток 4Т1 E6/E7 мыши контрольной группы имели нездоровый внешний вид, начали проявляться признаки истощения и потери массы тела, снижение активности, потускнение и пожелтение волосяных покровов, незначительное увеличение регионарных (относительно произведенной инъекции клеток) лимфоузлов. На 27-е сут после инъекции клеток 4Т1 E6/E7 в контрольной группе мышей были зафиксированы три случая летального исхода, наиболее вероятной причиной которых послужило активное разрастание аутографтов с инвазией в брюшную полость и последующим поражением внутренних органов.

На 18-е сут после инъекции клеток 4Т1 E6/E7 была детектирована статистически значимая разница между аутографтами контрольной и опытных групп. На основании дальнейших произведенных измерений линейных параметров аутографтов (“ширина” и “длина”) был рассчитан объем аутографтов по формуле (1) и построен график зависимости объема аутографтов от количества суток после инъекции клеток 4Т1 E6/E7 (рис. 5а). На 30-е сут после инъекции клеток 4Т1 E6/E7 объем аутографтов опытных групп был в среднем в 5 раз меньше, чем объем аутографтов контрольной группы, причем наименьшим объемом среди опытных групп характеризовались аутографты группы CBD1 – до 11 раз меньше, а наибольшими – аутографты группы CBD3 – до 5.2 раз меньше по сравнению с животными контрольной группы.

По окончании исследований (на 30-е сут после инъекции клеток 4Т1 E6/E7) сформированные

аутографты извлекали и измеряли третий линейный параметр (“высоту”), с использованием которого был рассчитан их терминальный объем по аппроксимированной формуле объема эллипсоида (2). Благодаря использованию данной формулы было выявлено, что объем аутографтов мышей опытных групп меньше аутографтов мышей контрольной группы в среднем в 8.5 раз; аутографтов группы CBD1 – до 18.2 раз, а CBD3 – до 8.8 раз (рис. 5б).

По результатам взвешивания терминальных аутографтов было установлено, что аутографты опытных групп легче аутографтов контрольной группы в среднем в 5.7 раз; аутографты группы CBD1 – до 11.5 раз, а CBD3 – до 6 раз (рис. 5в).

Для комплексной оценки противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций также следует учитывать внешний вид аутографтов как в процессе мониторинга *in vivo*, так и после их извлечения по окончании эксперимента. На 18-е сут после инъекции клеток 4Т1 E6/E7 по результатам визуального осмотра было детектировано наличие очагов некроза в зоне формирования аутографтов у животных опытных групп в 30–40% случаев, в то время как у аутографтов контрольной группы очаги некроза полностью отсутствовали. На момент завершения эксперимента у аутографтов опытных групп явно детектировался центральный некроз в 60–90% случаев. У аутографтов контрольной группы очаги некроза появились только к 27-м сут после инъекции клеток 4Т1 E6/E7, число случаев появления которых возросло до 40% к моменту терминирования (рис. 5г, 5д).

На основании данных, полученных в ходе мониторинга животных, и анализа кривых роста, терминального объема и веса аутографтов можно сделать вывод о наличии потенциального проти-

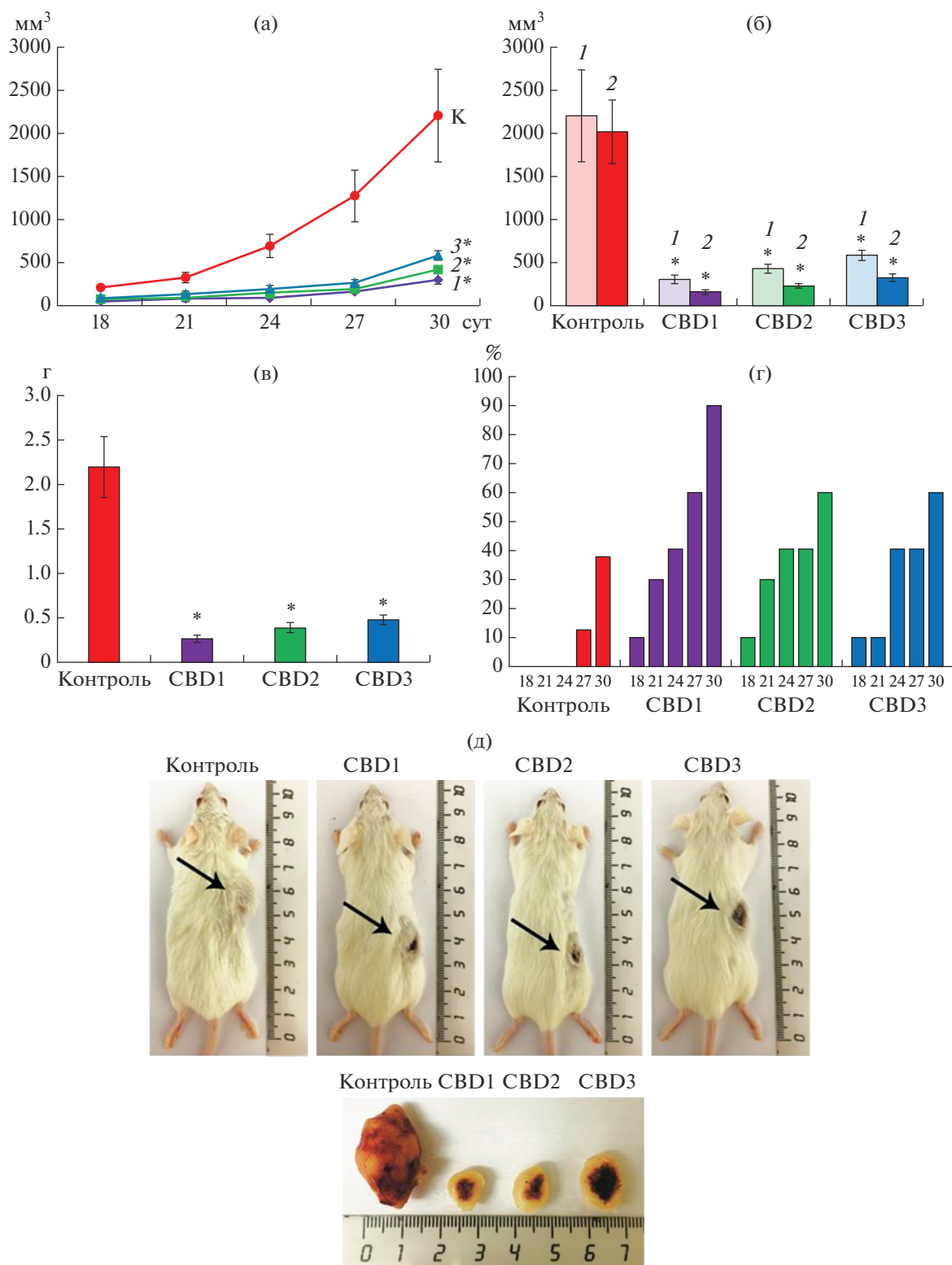


Рис. 5. Оценка эффективности иммуногенных композиций CBD1–CBD3 *in vivo* на экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ16-ассоциированными опухолями: а – динамика роста аутографтов после трехкратного введения иммуногенных композиций (указаны сутки после инъекции опухолевых клеток 4Т1 Е6/Е7); К – контроль, 1 – CBD-1, 2 – CBD-2, 3 – CBD-3; б – объем терминальных аутографтов: 1 – объем, рассчитанный с использованием двух линейных параметров по формуле (1); 2 – объем, рассчитанный с использованием трех линейных параметров по формуле (2); в – вес терминальных аутографтов; г – динамика появления очагов некроза у аутографтов мышей контрольной и опытных групп (цифры под столбцами – сутки после инъекции опухолевых клеток 4Т1 Е6/Е7); д – внешний вид типичных для каждой группы терминированных животных со сформированными аутографтами (указаны стрелки) и извлеченных аутографтов. * $p < 0.05$ (статистически значимая разница между контрольной и опытными группами по *t*-критерию Стьюдента).

воопухолевого эффекта у исследуемых иммуногенных композиций CBD1–CBD3. Иммуногенные композиции CBD2 и CBD3, содержащие рекомбинантные антигены Е6-CBD и Е7-CBD по отдельности, обладали противоопухолевым эффектом. Однако противоопухолевый эффект композиции CBD1 был выше, следовательно, для достижения наибольшей противоопухолевой активности в состав иммуногенной композиции должны входить оба рекомбинантных антигена Е6-CBD и Е7-CBD (композиция CBD1).

Таким образом, в результате проведенных исследований синтезом в *E. coli* впервые были получены препараты рекомбинантных белков, представляющих собой антигены Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа, соединенные с помощью глицин-серинового спейсера с целлюлозосвязывающим доменом из *Anaerocellum thermophilum*. Использование данного домена в составе слитных рекомбинантных белков позволило разработать простую и эффективную одностадийную технологию выделения и очистки белковых препаратов.

Наличие антигенных свойств у полученных рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD подтверждено методом вестерн-блоттинга с использованием коммерческих антител к антигенам Е6 и Е7 ВПЧ16.

Анализ активации гуморального ответа и противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций на основе рекомбинантных антигенов Е6-CBD и Е7-CBD ВПЧ16 в условиях 3-этапной иммунизации мышей линии BALB/с показал, что специфические компоненты иммуногенных композиций – рекомбинантные антигены Е6-CBD и Е7-CBD – являются высокоиммуногенными и обладают противоопухолевым эффектом *in vivo*.

Приведенные характеристики позволяют считать полученные в работе новые рекомбинантные антигены Е6-CBD и Е7-CBD перспективными для изучения возможности их медицинского применения в двух направлениях: 1) в клинической практике – в качестве основных специфических компонентов разрабатываемых терапевтических вакцин для лечения ВПЧ16-ассоциированных неопластических поражений различных локализаций (рак шейки матки, карциномы аногенитального тракта, ротоглотки); 2) в диагностике – при разработке диагностических наборов для выявления антител к белкам Е6 и Е7 у пациентов с ВПЧ16-ассоциированными злокачественными новообразованиями.

Работа выполнена в рамках государственного задания федерального государственного бюджетного учреждения “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” Федерального медико-биологического агентства № 388-00102-20-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на лабораторных мышах линии BALB/с проводили в строгом соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Treaty Series, № 123).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Вонский М.С., Рунов А.Л., Гордейчук И.В., Исагуляни М.Г.* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 7. С. 1016–1035. <https://doi.org/10.1134/S0320972519070108>
2. *Вонский М.С., Шабалева М.Г., Рунов А.Л., Лебедева Н.Н., Човдхари С., Палефский Д.М., Исагуляни М.Г.* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 7. С. 995–1015. <https://doi.org/10.1134/S0320972519070091>
3. *Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A.* // CA Cancer J. Clin. 2018. V. 68. P. 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
4. *Bruni L., Albero G., Serrano B., Mena M., Gómez D., Muñoz J., Bosch F.X., de Sanjosé S.* // Human Papillomavirus and Related Diseases Report. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), 2019. 315 p., <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
5. *Liu Z., Tasnuva R., Nyitray A.* // Sex. Health. 2016. V. 13. P. 10–21. <https://doi.org/10.1071/SH15089>
6. *Зароченцева Н.В., Белая Ю.М., Самсыгина Г.А., Щербакowa М.Ю., Выжлова Е.Н., Малиновская В.В.* // Лечащий врач. 2017. Т. 4. С. 56–63.
7. *Hancock G., Hellner K., Dorrell L.* // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2018. V. 47. P. 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.09.008>
8. *Klingelutz A.J., Roman A.* // Virology. 2012. V. 424. № 2. P. 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.018>
9. *Arbyn M., Xu L., Simoens C., Martin-Hirsch P.P.L.* // Cochrane Database Syst. Rev. 2018. V. 5. CD009069. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009069.pub3>
10. *Cheng M.A., Farmer E., Huang C., Lin J., Hung C.F., Wu T.C.* // Hum. Gene Ther. 2018. V. 29. P. 971–996. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.197>
11. *Yang A., Farmer E., Lin J., Wu T.C., Hung C.F.* // Virus Res. 2017. V. 231. P. 148–165. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.002>
12. *Nakagawa M., Stites D.P., Patel S., Farhat S., Scott M., Hills N.K., Palefsky J.M., Moscicki A.B.* // J. Infect. Dis. 2000. V. 182. P. 595–598. <https://doi.org/10.1086/315706>
13. *Combes J.D., Pawlita M., Waterboer T., Hammouda D., Rajkumar T., Vanhems P., Sniijders P., Herrero R., Franceschi S., Clifford G.* // Int. J. Cancer. 2014. V. 135. P. 2453–2461. <https://doi.org/10.1002/ijc.28888>

14. McIntyre M.C., Frattini M.G., Grossmon S., Laimons L.A. // *J. Virol.* 1993. V. 67. № 6. P. 3142–3150. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.6.3142-3150.1993>
15. Pahel G., Aulabaugh A., Short S.A., Barnes J.A., Painter G.R., Ray P., Phelps W.C. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 68. № 34. P. 26018–26025.
16. Patrick D.R., Zhang K., Defeo-Jones D., Vuocolo G.R., Maigetter R.Z., Sardana M.K., Oliff A., Heimbrook D.C. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 10. P. 6910–6915.
17. Imai Y., Tsunokawa Y., Sugimura T., Terada M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V. 164. № 3. P. 1402–1410. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91826-3](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91826-3)
18. Verma R.R., Sriraman R., Rana S.K., Ponnanna N.M., Rajendar B., Ghantasala P., Rajendra L., Matur R.V., Srinivasan V.A. // *Protein Expr. Purif.* 2013. V. 92. № 1. P. 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.010>
19. Nomine Y., Ristriani T., Laurent C., Lefevre J.F., Weiss E., Trave G. // *Protein Expr. Purif.* 2001. V. 23. № 1. P. 22–32. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1451>
20. Xu M.L., Kim S.C., Kim H.J., Ju W., Kim Y.H., Kim H.J. // *Protein Expr. Purif.* 2017. V. 132. P. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.01.004>
21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, New York, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 654 p.
22. Лящук А.М., Лукин В.Г., Карягина А.С., Лаврова Н.В., Родионова И.В., Кормилицына М.И. и др. // *ЖМЭИ.* 2006. Т. 4. С. 65–68.
23. Сергиенко О.В., Лящук А.М., Аксенова Е.И., Галушклина З.М., Полетаева Н.Н., Шаранова Н.Е. и др. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2012. № 1. С. 16–20.
24. Velikodvorskaya G.A., Tikhonova T.V., Gurvits I.D., Karyagina A.S., Lavrova N.V., Sergienko O.V. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 8071–8075. <https://doi.org/10.1128/AEM.01517-10>
25. Fernando G.J., Murray B., Zhou J., Frazer I.H. // *Clin. Exp. Immunol.* 1999. V. 115. P. 397–403. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00813.x>
26. Petrone L., Ammendolia M.G., Cesolini A., Caimi S., Sulperti F., Giorgi C., Di Bonito P. // *J. Transl. Med.* 2011. V. 9. № 69. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-69>

Recombinant Antigens E6 and E7 of Human Papillomavirus Type 16: Preparation, Purification, Evaluation of Immunogenicity and Antitumor Effect *in vivo*

M. E. Subbotina^{a, b, *}, T. M. Grunina^{a, b}, O. V. Sergienko^b, N. V. Elkina^c, D. S. Elkin^c,
M. V. Novikova^c, P. B. Kopnin^c, and S. V. Vinokurova^c

^aCentre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121 Russia

^bAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

^cResearch Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia

*e-mail: subbotinam@gmail.com

Recombinant proteins CBD-E6 and CBD-E7, which are antigens E6 and E7 of the human papillomavirus of high carcinogenic 16 (HPV16), connected with a glycine serine spacer with a cellulose-binding domain (CBD) from *Anaerocellum thermophilum*, were obtained by synthesis in a heterologous expression system in *Escherichia coli*. A simple and effective one-step technology for isolation and purification of recombinant proteins E6-CBD and E7-CBD was developed. The presence of antigenic properties in the obtained protein preparations was confirmed by Western blotting. Three variants of immunogenic compositions with the recombinant proteins E6-CBD, E7-CBD and a 3-stage immunization scheme were developed, immunogenicity was assessed in BALB/c mice, the antitumor effect of the immunogenic compositions was studied using the experimental model of BALB/c mice with HPV16-associated tumors. E6-CBD and E7-CBD have been shown to be highly immunogenic and have an antitumor effect *in vivo*. To achieve the greatest efficiency in the composition of the immunogenic composition, the presence of both E6-CBD and E7-CBD proteins is required. The obtained recombinant proteins E6-CBD and E7-CBD HPV16 can be used in two directions: 1) in clinical practice – as the main specific components of therapeutic vaccines for the treatment of HPV16-associated neoplastic lesions of various localizations (cervical cancer, carcinoma of the anogenital tract, oropharynx); 2) in diagnostics – in development of diagnostic kits for detecting antibodies to E6 and E7 oncoproteins in patients with HPV16-associated malignant neoplasms.

Keywords: human papillomavirus, oncogenic proteins E6 and E7, cervical cancer, therapeutic vaccines, immunogenicity, antitumor effect