

УДК 577.27

А.В. ЛЕТАРОВ<sup>1,\*</sup>, Ю.К. БИРЮКОВА<sup>2</sup>, А.С. ЕПРЕМЯН<sup>3</sup>, А.Б. ШЕВЕЛЕВ<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, 119071

<sup>2</sup>Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова, Москва, 142782

<sup>3</sup>Научно-производственный центр «Армбиотехнология» НАН Республики Армения, Государственная некоммерческая организация, Ереван, Армения, 0056

<sup>4</sup>ООО «Иннотех-21», Люберцы, Московская область, 140000

e-mail: letarov@gmail.com

## Перспективы использования вирусоподобных частиц на основе белков бактериофагов для создания вакцин против сибирской язвы

Во всем мире производство вакцин отстает по показателям рентабельности от других продуктов на фармацевтическом рынке. Поэтому себестоимость вакцинных субстанций существенно влияет на доступный потребителю ассортимент производимых вакцин. Особенно это касается вакцин ветеринарного назначения. В настоящем обзоре проведен анализ опубликованных данных о существующих вакцинах, который позволяет сделать вывод о более высокой иммуногенности субстанций на основе цельных вирусных частиц по сравнению с растворимыми антигенами. Высказывается предположение, что именно этот фактор, физиологическая основа которого остается неизвестной, не позволил внедрить в практику описанные в литературе многочисленные варианты рекомбинантных вакцин. На практике все применяемые противовирусные вакцины кроме вакцин против вируса гепатита В основаны на использовании вирусных частиц, получаемых классическими культуральными методами. С учетом этого наблюдения выдвигаются подходы к созданию универсальной платформы для производства рекомбинантных вакцин в форме вирусоподобных частиц. Для этого предлагается использовать технологию получения слипых бифункциональных производных на основе структурных белков бактериофагов, несущих целевые антигены. Подход излагается на примере традиционного вакцинного антигена — протективного антигена возбудителя сибирской язвы.

*Ключевые слова:* бактериофаги, биотехнология, вирусоподобные частицы, дисплей, протективный антиген, рекомбинантные вакцины, сибирская язва, *Bacillus anthracis*.

Использование рекомбинантных белков в качестве основы для вакцин имеет целый ряд преимуществ по сравнению с традиционными. Для первых характерен высокий уровень биологической безопасности, так как в процессе изготовления не используются, а в самой готовой субстанции рекомбинантного белка не содержатся пато-

генные бактерии, вирусы или продукты их жизнедеятельности. Кроме того, рекомбинантные технологии позволяют применять для конструирования вакцин отдельные антигены и даже их фрагменты, что обеспечивает высокую специфичность ответа. Однако до настоящего времени на рынке практически отсутствуют вакцины на основе рекомби-

Летаров Андрей Викторович, Бирюкова Юлия Константиновна, Епремян Асмик Суменовна, Шевелев Алексей Борисович.

*Список сокращений:* ВГЕ — вирус гепатита Е; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита; ВПЧ — вирусоподобные частицы; КА — инактивированный коклюшный антиген; пг — продукт гена (фагового генома); ФГА — филаментозный гемагглютинин *B. pertussis*; ЕФ — отечный фактор; НА — гемагглютинин (основной поверхностный антиген вируса гриппа); НВsAg — малый поверхностный антиген вируса гепатита В; LF — летальный фактор; РА — протективный антиген.

\* Автор для переписки.

нантных белков. Единственным значимым исключением является вакцина против вирусного гепатита В.

В случае противовирусных вакцин основной причиной такого положения является тот факт, что субъединичные вакцины на основе растворимых антигенов уступают по иммуногенности цельновирионным, что приводит к необходимости использования более высоких доз рекомбинантных антигенов по сравнению с природными. Причина повышенной иммуногенности антигена, имеющего наноразмерную корпускулярную структуру, остается неизвестной.

Целью настоящего обзора является анализ возможных подходов к изучению механизма повышения иммуногенности антигена при его полимеризации и к использованию этого явления для создания рекомбинантной вакцины против актуальной инфекции — сибирской язвы с применением вирусоподобных частиц на основе белков бактериофагов, декорированных протективным антигеном *Bacillus anthracis*.

#### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОСТИ СУЩЕСТВУЮЩИХ ВАКЦИННЫХ СУБСТАНЦИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ СПОСОБНОСТИ К ФОРМИРОВАНИЮ НАНОРАЗМЕРНЫХ АГРЕГАТОВ

В таблице приведены сведения о дозировке основной субстанции в различных вакцинах, разрешенных к применению в РФ. (В перечне вакцин, разрешенных к применению в РФ на официальном сайте Роспотребнадзора РФ <http://www.28.gospotrebнадзор.ru/activity/?p=1145>, только для части вакцин указано содержание основной субстанции в единицах массы. Следовательно, производители предоставляют потребителю этот показатель по собственному усмотрению и список не является исчерпывающим.)

Из таблицы видно, что наименьшая доза антигена — 1,5—3 мкг на дозу — используется при изготовлении цельновирионных инактивированных вакцин против клещевого энцефалита (ФСМЕ и Энцепур) и ветеринарной вакцины против ящура. При вакцинации от сибирской язвы используется протективный антиген в дозе от 50 до 4800 мкг. При этом необходимо учитывать, что в состав вирусных частиц входит не один чистый антиген, а набор белков, среди которых «нейтрализуемые» поверхностные антигены составляют, как правило, 1—5%. С учетом этих данных можно утверждать, что иммуногенность натуральных вирусных частиц вируса клещевого энцефалита и

ящура в 200—400 раз выше, чем у протективного антигена *Bacillus anthracis*, который многие авторы относят к высокоиммуногенным бактериальным белкам [5].

Увеличение иммуногенности белковых антигенов за счет создания искусственных вирусоподобных частиц (ВПЧ), экспонирующих целевой антиген на своей поверхности, описано в работе [6]. Сходные результаты опубликованы и в обширной литературе по использованию в качестве адъюванта основного белка жгутиков *Salmonella typhimurium* — флагеллина [7, 8]. Эти и многие другие авторы считают, что основой гипериммуногенности флагеллина (и искусственных белков на его основе) является сочетание способности этого белка к формированию линейных полимеров и высокой аффинности к нему рецепторов макрофагов и дендритных клеток TLR5.

Еще один подход к получению рекомбинантных антигенов в наноструктурированной форме с целью увеличения иммуногенности описан в работе [9]. При этом наноструктуризация антигена достигается за счет сорбции слитых бифункциональных белков-антигенов, имеющих в своем составе полисахарид-связывающие домены, на полисахаридных наночастицах. Аналогичное решение с применением наночастиц полифосфазола при создании вакцины против коклюша описано в работе [10].

В то же время, само по себе формирование ВПЧ не является достаточным условием повышения иммуногенности до уровня, характерного для нативных вирусных частиц. Из таблицы видно, что антиген HBsAg вируса гепатита В, имеющий форму ВПЧ [11, 12], используется в вакцинах в относительно высоких концентрациях ~20 мкг на дозу, характерных скорее для растворимых антигенов с высокой иммуногенностью. Кроме того, антигены возбудителя коклюша *B. pertussis* — коклюшный антиген, филаментозный гемагглютинин и пертактин — также склонны к формированию агрегатов, в связи с чем сложно решить, относить ли их к растворимым белкам или ВПЧ [13]. Аналогичная трудность с интерпретацией данных касается и поведения очищенного НА вируса гриппа, несомненно склонного к агрегации даже в отсутствие других структурных белков вируса гриппа.

Неоднозначные результаты получены и при использовании рекомбинантных ВПЧ, сформированных капсидным антигеном вируса гепатита Е [14]. Разработанная китайской компанией «Xiamen Innovax Biotech» вакцина против вируса гепатита Е HEV239 (коммерческое название Hecolin) [15] в 2012 г. прошла третью фазу клинических ис-

**Содержание основной субстанции в некоторых инактивированных вакцинах, разрешенных к применению в РФ**  
**Content of main substances in some inactivated vaccines that are approved for use in RF**

Название вакцины Vaccine	Производитель Manufacturer	Антиген Antigen	Содержание антигена, мкг на дозу Content of antigen, µg/dose	Ссылка Reference
1	2	3	4	5
Вакцина рекомбинантная Recombinant vaccine	“Микроген”, Россия Microgen, Russia	HBsAg	20—40	<a href="http://www.vakcina.ru/gepatit_vak4.shtml">http://www.vakcina.ru/gepatit_vak4.shtml</a>
Эувакс Euvacs	LG Кемикал Лтд., Корея LG Chemical Ltd., Korea	HBsAg	20	<a href="http://www.vakcina.ru/gepatit_vak2.shtml">http://www.vakcina.ru/gepatit_vak2.shtml</a>
Энджерикс В Engerix V	Смит Кляйн Бичем, Бельгия Smith Klein Beacham, Belgium	HBsAg	20	<a href="http://www.vakcina.ru/gepatit_vak3.shtml">http://www.vakcina.ru/gepatit_vak3.shtml</a>
Вакцина гриппозная инактивированная элюат- центрифужная жидкая Flu inactivated eluate- centrifuged liquid vaccine	“Микроген”, Россия Microgen, Russia	HA	5+5+11	<a href="http://www.epidemiolog.ru/catalog_vac/index.php?SECTION_ID=&amp;ELEMENT_ID=2598">http://www.epidemiolog.ru/catalog_vac/index.php?SECTION_ID=&amp;ELEMENT_ID=2598</a>
Гриппол, Гриппол Нео, Гриппол Плюс Grippol Grippol Neo Grippol Plus	“Микроген”, Россия Microgen, Russia	HA	5+5+11	<a href="http://www.microgen.ru/products/grippol/instruction/">http://www.microgen.ru/products/grippol/instruction/</a>
Моногриппол Monogrippol	“Петровакс”, Россия Petrovacs, Russia	HA	5	<a href="http://www.petrovax.ru/print.php?ac=news&amp;news_id=290">http://www.petrovax.ru/print.php?ac=news&amp;news_id=290</a>
Грипповак Grippovac	“Петровакс”, Россия Petrovacs, Russia	HA	(18—22) + + (24—28)	<a href="http://www.drugreg.ru/Bases/WebReestrDrugListInstr.Asp?TradeNmNx=16999&amp;InnNx=1700">http://www.drugreg.ru/Bases/WebReestrDrugListInstr.Asp?TradeNmNx=16999&amp;InnNx=1700</a>
Грифор Grifor	“Форт”, Россия Fort, Russia	HA	45	[1] <a href="http://www.epidemiolog.ru/catalog_vac/?ELEMENT_ID=1345&amp;SECTION_ID">http://www.epidemiolog.ru/catalog_vac/?ELEMENT_ID=1345&amp;SECTION_ID</a>
ФСМЕ FSME	Бакстер, Австрия Baxter, Austria	ВКЭ Tick borne encephalitis	2,38	<a href="http://vakcina.ru/i_klesh_03">http://vakcina.ru/i_klesh_03</a>

1	2	3	4	5
Энцекур Entsepur	Новартис Вакцинс и Диагностикс ГмбХ и Ко, Германия Novartis Vaccines und Diagnostische GmbH and Co, Germany	ВКЭ Tick borne encephalitis	1,5	<a href="http://ilive.com.ua/health/privivka-ot-kleshchevogo-encefalita_70384i16110.html">http://ilive.com.ua/health/privivka-ot-kleshchevogo-encefalita_70384i16110.html</a>
Инфанрикс Infanriks	Глаксо Смит Кляйн Байолоджиалз, Бельгия Glaxo Smith Klein Biologicals, Belgium	КА, ФГА, пертактин Pertussis antigen, <i>B. pertussis</i> filamentous antigen, Pertactin	25+25+8	<a href="http://www.privivkam.net/info.php?s=3&amp;id_1=012&amp;id_2=017&amp;id_3=000035">http://www.privivkam.net/info.php?s=3&amp;id_1=012&amp;id_2=017&amp;id_3=000035</a>
Вакцина против ящура универсальная сорбиро- ванная моновалентная Foot-and-mouth disease universal adsorbed monovalent vaccine	Щелковский биокомбинат Shchelkovskii Biocombinat	Вирус ящур Foot-and-mout h virus	3	Патент РФ № 2526570, 2012 [2] Patent RF 2526570, 2012 [2] <a href="http://www.fips.ru/Archive/PAT/2014FULL/2014.08.27/DOC/RUNWC2/000/000/002/526/570/document.pdf">http://www.fips.ru/Archive/PAT/2014FULL/2014.08.27/DOC/RUNWC2/000/000/002/526/570/document.pdf</a>
Вакцина сибиреязвенная комбинированная Anthrax combined vaccine	“Микроб”, Россия Microbe, Russia	РА	50	Микшис Н.И., автореферат дисс. докт. мед. наук, 2009 и [3] Mikshis, N.I., Thesis Diss. (Doctor Med. Sci.), 2009 and [3]
Anthrax adsorbed vaccine	Мичиганское Управление здравоохранения Michigan Department of Public Health	РА	4800	Патент РФ № 2115433, 1998 [4] Patent RF 2115433, 1998 [4]

пытаний на двух группах из 50 000 человек каждая. Испытания проводились в провинции Цзянсу в течение 12 мес и показали высокую эффективность препарата [16]. Однако в 2014 г. производство вакцины было свернуто из-за высокой себестоимости, не обеспечивающей рентабельности производства. Косвенно это свидетельствует о недостаточной иммуногенности ВПЧ на основе капсидного белка ВГЕ.

В настоящее время в США в стадии испытаний находятся 88 вакцин, основанных на примене-

нии ВПЧ самого различного происхождения (clinicaltrials.gov). Большинство этих препаратов предназначено для борьбы с вирусными инфекциями людей. По подсчетам [17], было сконструировано около 110 различных вариантов ВПЧ, основанных на белках около 35 семейств вирусов. При создании противовирусных вакцин для защиты людей применяются в основном платформы на основе белков вирусов человека и животных, полученных в результате экспрессии соответствующих генов в эукариотических системах.

## ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ВПЧ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Альтернативой использованию белков эукариотических вирусов, применение которых часто требует сложных и дорогостоящих систем экспрессии в эукариотических клетках, может служить получение ВПЧ на основе частиц бактериофагов или их белков. Этот подход особенно актуален при конструировании ветеринарных вакцин, для которых ценовые ограничения играют большую роль, чем при создании вакцин для защиты людей. Бактериофаги известны как объекты, с которыми удобно работать, а гены их белков, как правило, хорошо экспрессируются в общедоступных прокариотических системах [18—20]. Частицы многих фагов стабильны при длительном хранении.

Классические системы фагового дисплея, разработанные в 90-е годы, стали важным инструментом фундаментальных исследований. Они с успехом использовались при скрининге библиотек случайных пептидов и антиген-распознающих фрагментов антител. Как правило, эти системы основаны на использовании нитчатых фагов семейства *Inoviridae*, например, фага M13 [21, 22]. Несмотря на успех в вышеназванных приложениях системы с участием нитчатых фагов имеют ряд существенных недостатков, ограничивающих их применимость в технологиях создания вакцин. Во-первых, процесс сборки нитчатого фага требует транспорта всех структурных белков вируса через Sec-систему клетки и транзиторного включения их в цитоплазматическую мембрану [23]. Далеко не любые полипептиды вакцинного назначения пригодны для данного процесса. Крупные белки, подобные PA83 *B. anthracis*, могут представлять особое затруднение для транспорта [24]. Во-вторых, для экспонирования множественных копий антигена требуется применять слияние с основным белком оболочки нитчатого фага (pVIII). Однако в этом случае по стерическим соображениям нести экспонируемые домены может лишь небольшая часть субъединиц (т. е. необходимо «разбавлять» химерные субъединицы субъединицами дикого типа). Это может привести к нерегулярному размещению молекул антигена на поверхности вириона и тем самым лишить ВПЧ необходимой гипериммуногенности [5]. Поэтому при создании вакцинных субстанций предпочтительной является экспозиция антигенов на частицах хвостатых фагов порядка *Caudovirales*. Далее мы рассмотрим несколько принципиальных решений проблемы экспонирования антигенов на ВПЧ с использованием этих бактериофагов.

## Дисплей на субъединицах главного белка капсида

Главный белок капсида является наиболее массово представленным полипептидом в частице хвостатого фага. Возможности презентации дополнительных доменов на таких белках ограничены тем, что они могут интерферировать со сборкой и созреванием капсидов. Тем не менее, с помощью систем для дисплея пептидов на С-конце пг (продукт гена) 10 фага T7, поставляемых фирмой Novagen (США), удавалось добиться экспонирования небольших белковых доменов массой ~10 кДа [25]. Использование таких ВПЧ требует обычно применения жизнеспособного фага-помощника, так как в большинстве случаев сборка капсидного белка в регулярные структуры происходит с участием нескольких вирусных белков.

Имеются, однако, редкие исключения. Например, белок капсида  $\lambda$ -подобного фага НК97 эффективно собирается в капсидоподобные икосаэдрические частицы с осью симметрии 7-го порядка без помощи других белков этого фага [26]. При этом субъединицы данного белка оказываются сшиты в «кольчужную» структуру за счет автокаталитического ковалентного кросс-линкинга [27]. Хотя эта особенность белка капсида фага НК97 активно используется в структурно-биологических исследованиях процесса созревания капсида [27, 28], данных о создании ВПЧ на основе этого белка найти не удалось.

## Дисплей на декорирующих белках головки

Большинство хвостатых бактериофагов обладают так называемыми декорирующими белками головки вируса. Эти белки связываются с локальными осями симметрии 6-го (середина гексамера главного белка капсида) или 3-го (стык трех соседних гексамеров) порядков, причем присоединение этих белков происходит уже после сборки и созревания капсида [29]. Например, фаг T4 имеет два декорирующих белка — пг *hoc* и пг *soc*. Оба эти белка могут использоваться как носители экспонируемых пептидов. Пг *hoc*, по-видимому, более эффективен при дисплее крупных белков. Его С-концевой домен отвечает за присоединение к капсиду в центре гексамеров главного белка капсида фага T4, пг 23, а на N-конце имеются три тандемно расположенных иммуноглобулинподобных (Ig-подобных) домена, структура которых была недавно установлена [30]. Одна из

функций этих Ig-подобных доменов, по-видимому, состоит во взаимодействии с полисахаридами слизистого слоя поверхности кишечника (с полисахаридной частью муцина), что может давать фагу экологические преимущества [31]. T5-подобные бактериофаги также содержат декорирующий белок — pb10 капсида, — занимающий центр гексамеров главного капсидного белка [32]. На С-конце этого белка имеется Ig-подобный домен, последовательность которого может варьировать у различных бактериофагов данной группы вплоть до добавления дополнительного домена, что свидетельствует о том, что С-конец этого белка может служить удобной платформой для экспонирования антигенов. Интересно, что связывание белка pb10 с головкой фага является исключительно прочным; константа нестойкости составляет менее  $10^{-13}$  М (E. Vernhes, Université Paris-Sud, Франция, личное сообщение).

Дополнительные возможности создания ВПЧ на основе капсидов и их декорирующих белков создаются за счет того, что у некоторых бактериофагов сборка капсидоподобных частиц может быть осуществлена путем гетерологичной экспрессии или даже *in vitro* с использованием очищенных белков. Если морфогенез капсидов части фагов, таких как T4, является весьма сложным процессом, который может быть осуществлен только с использованием жизнеспособного фага, то у вирусов, располагающих вместо белков скаффолда так называемыми дельта-доменами главного белка капсида, процесс сборки проголовки воспроизводится достаточно легко. Так, головки фага T5 были полностью реконструированы *in vitro* с использованием очищенных белков [33, 34]. Расширение и созревание проголовок также было успешно воспроизведено *in vitro* [35], что открывает возможности для легкого присоединения к такому капсиду рекомбинантного декорирующего белка pb10. Оказалось возможным также собрать капсид фага P2, у которого белок скаффолда представляет собой отдельный полипептид. Для этого был получен слитый полипептид, содержащий белок скаффолда и главный белок капсида [36]. Однако очевидным недостатком подобных решений является их значительная технологическая сложность, что затрудняет перенесение таких процедур из лаборатории в производство, а также ограничивает возможности применения альтернативных микроорганизмов продуцентов (большинство описанных ВПЧ получены с использованием экспрессии генов белков в клетках *E. coli*).

#### ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ВЕТЕРИНАРНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЕЕ

Вакцинация — исторически первое [37] и на сегодняшний день наиболее эффективное средство специфической профилактики бактериальных и вирусных заболеваний людей и животных. В настоящее время существует несколько подходов к изготовлению вакцинных субстанций. Это получение аттенуированных живых возбудителей, использование убитых клеток или инактивированных вирусных частиц вирулентных штаммов, а также различные варианты субъединичных вакцин, в которых используются отдельные компоненты возбудителей, либо выделенные из их активных культур, либо полученные генно-инженерным путем. Особо следует отметить такой тип вакцин как анатоксины — инактивированные экзотоксины бактерий, вызывающие выработку токсинейтрализующих антител, что эффективно защищает человека или животное от бактериальных инфекций, в патогенезе которых выработка экзотоксина имеет определяющее значение.

Вакцинация животных от сибирской язвы является первым в истории примером создания и коммерциализации вакцины на основе аттенуированного штамма возбудителя, который был получен в лаборатории Луи Пастера [37]. Живые сибиреязвенные вакцины используются по настоящее время. В России для вакцинации людей применяется вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1, а для ветеринарных целей — штамм 55-ВНИИВВиМ [5]. Вакцинация от сибирской язвы сельскохозяйственных животных входит в число обязательных ветеринарных мероприятий. Взрослому крупному рогатому скоту делают прививки против сибирской язвы один раз в год, желателно весной, перед выгоном на пастбище; телятам и ягнятам — с 3-месячного возраста. Вакцинации подлежат также лошади, козы, и другие животные в случае их нахождения в неблагоприятном по сибирской язве районе.

Основными факторами патогенности *B. anthracis* являются капсульный полисахарид, который обуславливает устойчивость бактерий к фагоцитозу, и трехчастный экзотоксин. Синтез этих факторов патогенности обеспечивается двумя крупными плазмидами — pX02 и pX01, соответственно [5, 38, 39]. У традиционно используемого в РФ вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ в процессе аттенуации произошла потеря плазмиды pX02 и соответственно утрата способности к синтезу капсулы. Поэтому основной вклад в протектив-

ный иммунитет, формируемый данной вакциной, вносят токсиннейтрализующие антитела [5].

Из трех субъединиц сибиреязвенного токсина (РА — протективный антиген, ЕF — отечный фактор и LF — летальный фактор) наибольшее значение имеет развитие иммунного ответа к РА [40]. Этот белок массой 83 кДа представляет собой субъединицу, способную специфически связываться с рецепторами клеток, которых в настоящее время известно два — опухолевый эндотелиальный маркер (TEM8) и продукт гена морфогенеза капилляров 2 (CMG2) [38, 41]. После связывания с рецептором белок РА подвергается процессингу мембранной протеазой класса фуринов и утрачивает N-концевой домен массой 20 кДа (домен I, РА20). Образующийся при этом белок РА63 (63 кДа) формирует гептамерные или октамерные комплексы, с которыми связываются каталитически активные субъединицы ЕF и/или LF. После фагоцитоза связанного с мембраной токсина РА происходит транспорт каталитических субъединиц из эндоцитозного пузырька в цитоплазму клетки, где они проявляют свою ферментативную активность аденилатциклазы и металлопротеазы, опосредуя возникновение цитопатогенных эффектов токсина. В отсутствие РА каталитические субъединицы токсина не способны преодолеть клеточную мембрану, поэтому образование антител к РА полностью защищает от заражения сибирской язвой [42]. В этой связи РА является основным антигеном, используемым для создания вакцин и сывороток для заблаговременной и экстренной иммунопрофилактики сибирской язвы, хотя имеются работы, направленные на создание иммунитета против каталитических субъединиц или разработку низкомолекулярных ингибиторов этих белков для целей экстренной профилактики заболевания [43, 44].

Нейтрализующие антитела обнаруживаются в крови людей и животных в течение 6—12 мес после вакцинации, однако, как было показано, клетки иммунологической памяти, опосредующие образование антител к РА, сохраняются в течение как минимум нескольких лет, что обуславливает определенный уровень защиты от инфекции умеренными дозами возбудителя [45].

Структура протективного антигена была установлена методами рентгеноструктурного анализа как для мономера [46] (рис 1.), так и для гептамерной и октамерной форм РА63, в том числе — в виде комплексов с рецептором [47, 48]. Белок РА синтезируется в виде предшественника, имеющего N-концевой лидерный пептид, который отщепляется в процессе секреции из клеток *B. anthracis*.

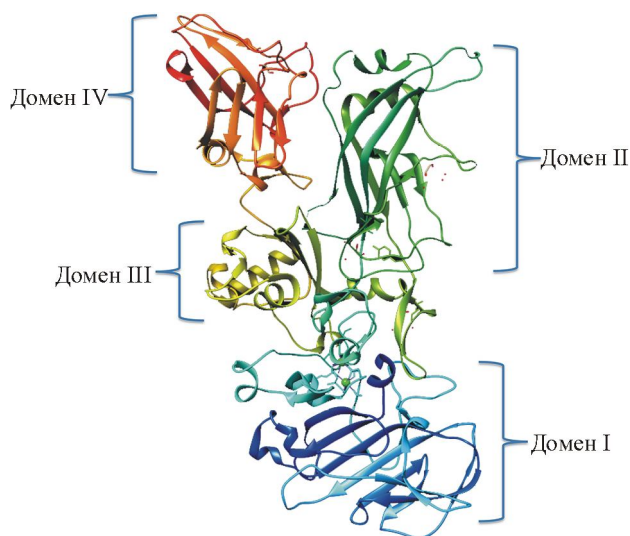


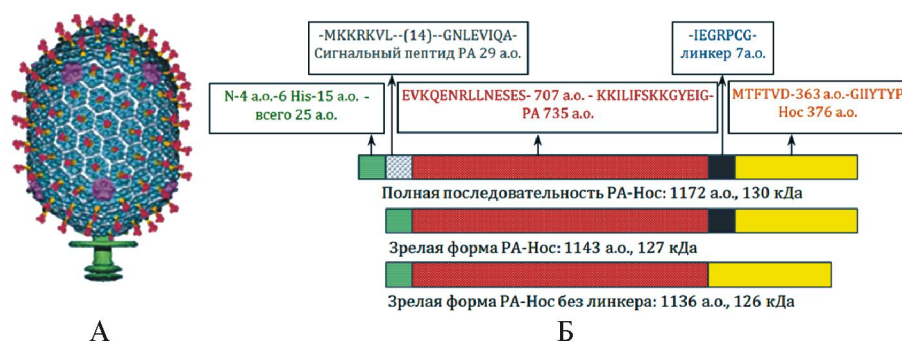
Рис. 1. Структура мономера РА83 PDB 1TZO (пояснения в тексте)

Fig. 1. Structure of PA83 monomer PDB 1TZO (see text for detail)

Образующийся при этом белок РА83 имеет 4 структурных домена [38, 46, 48].

Как полноразмерный РА83, так и его фрагменты, соответствующие домену I, доменам II—IV (РА63) и домену IV, способны с высоким выходом синтезироваться в клетках *E. coli* [5, 49—53].

Показано, что иммуногенность доменов РА различна. Так, в экспериментах [52] антитела более 62% клонов гибридом, полученных при иммунизации белком РА83 или абсорбированной вакциной AVA (на основе фильтрата культуральной жидкости вакцинного штамма *B. anthracis* Stern), узнавали N-терминальный домен РА. Домен I удаляется из состава РА вскоре после взаимодействия с рецептором и не играет роли в дальнейших событиях процесса интернализации. Исходя из этого можно было бы предположить, что иммунизация РА83 даст меньший протективный эффект по сравнению с РА63, так как выработка антител против РА20 приведет к трате ресурсов на образование антител, не имеющих защитной активности. Однако в работе [51] было показано, что иммунизация мышей полноразмерным РА дает существенно более высокую токсиннейтрализующую активность сыворотки, чем при иммунизации фрагментами, соответствующими доменам I, II—IV или изолированному домену IV. При этом у одной из групп мышей была достигнута высокая нейтрализующая активность при использовании свободного РА1. Авторы также идентифицировали ряд эпитопов, с которыми взаимодействуют индивидуальные моноклональные антитела к РА.



**Рис. 2.** А — модель капсида фага Т4 с экспонированными молекулами слитого белка Нос-РА83 [56], Б — схематическое изображение химерных белковых конструкций [56]

**Fig. 2.** А, a model of bacteriophage T4 capsid with displayed molecules of Hoc-PA83 fusion protein [56]; В (Б), the schematic representation of the chimeric proteins [56]

Предпринимались неоднократные попытки создать вакцину на основе продуцентов рекомбинантного РА, однако продуктивность многих предложенных штаммов оказывалась не выше, чем продуктивность вакцинного штамма; кроме того, экспрессия соответствующего гена не всегда была стабильной [54].

В заключение следует отметить, что высокие защитные дозы РА (от 50 мкг на голову крупного рогатого скота) в сочетании с дорогостоящей очисткой РА в процессе получения субъединичной вакцины не позволили наладить массовый выпуск препаратов ветеринарного назначения ни в одной стране мира. Таким образом, усилия по повышению иммуногенности РА83 в настоящее время сохраняют актуальность.

#### ПОДХОДЫ К КОНСТРУИРОВАНИЮ ВПЧ, ЭКСПОНИРУЮЩИХ ПРОТЕКТИВНЫЙ АНТИГЕН *Bacillus anthracis*

В работе [55] в экспонированные наружу петли белка капсида вируса FHV (Flock House Virus) был встроен связывающий домен рецептора сибиреязвенного токсина СМГ2 размером ~200 аминокислотных остатков (так называемый домен VWF-типа). В результате экспрессии гена этого белка в бакуловирусной экспрессионной системе образовывались ВПЧ, способные эффективно связывать свободный белок РА.

Опубликованы также и несколько вариантов решения проблемы экспозиции антигенов с помощью ВПЧ фагового происхождения. Одним из подходов является использование декорирующих белков капсида, описанных выше в соответ-

ствующем разделе. Декорирующий белок Нос фага Т4 присоединяется к капсиду в мономерной форме и его N-конец экспонирован в среду. Поэтому его удобно использовать для присоединения к капсиду фага Т4 различных крупных молекул, в том числе — полноразмерного РА83 [56]. В этой работе химерный белок, состоящий из последовательности РА83 без лидерного пептида и полной последовательности белка Нос, был получен путем экспрессии в *E. coli*, после чего он присоединялся *in vitro* к частицам фага Т4, лишенным собственного белка Нос в результате мутации. При этом практически 100% пг *hoc* в составе частиц приходилось на химерный вариант (рис. 2). Иммуногенность РА в составе таких ВПЧ была как минимум в 4 раза выше, чем у мономерного РА, адсорбированного на геле гидроксида алюминия. По нашему мнению, однако, эта величина недооценена, так как в работе утверждается, что для иммунизации использовали  $10^{10}$  частиц, несущих 1,8 мкг рекомбинантного белка. В то же время, подсчет количества белка, которое может разместиться на данном числе ВПЧ при полной загрузке соответствующих сайтов, приводит к почти на порядок меньшей величине.

Связывание химерных белков на основе Soc и Нос фага Т4 возможно также и *in vivo*, но при этом степень заполнения потенциальных сайтов связывания оказывается значительно меньше [56, 57].

Еще одним подходом к экспонированию РА83 на ВПЧ из фаговых белков является его размещение на основных структурных белках капсида при терминальном расположении экспонируемого полипептида. Предсказать возможность успешного введения дополнительных доменов в



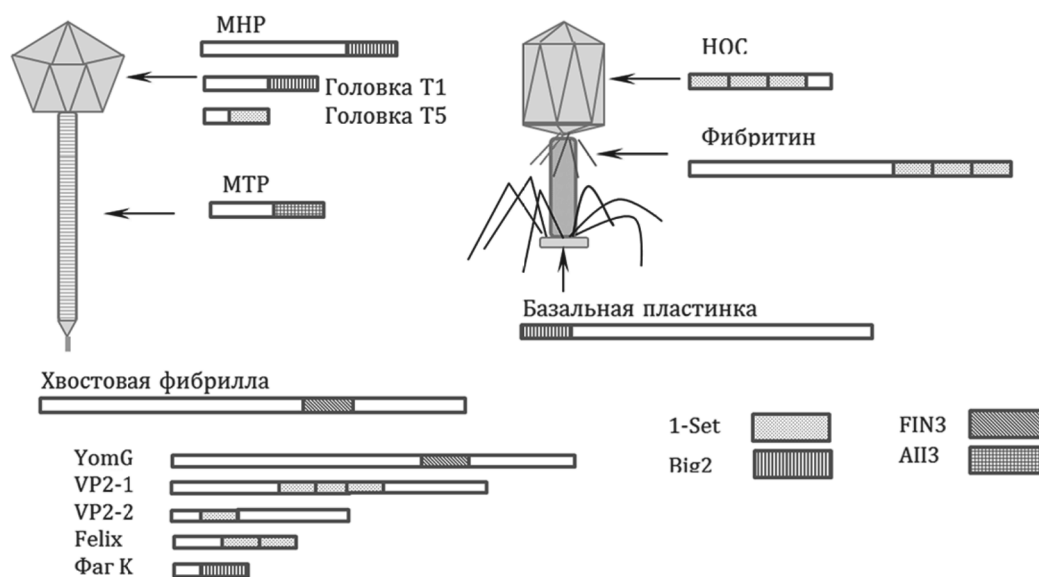


Рис. 3. Локализация разных белков с различными типами Ig-подобных доменов в частицах бактериофагов [58]

Fig. 3. Localization of the proteins carrying various types Ig-like domains in the virions of the bacteriophages [58]

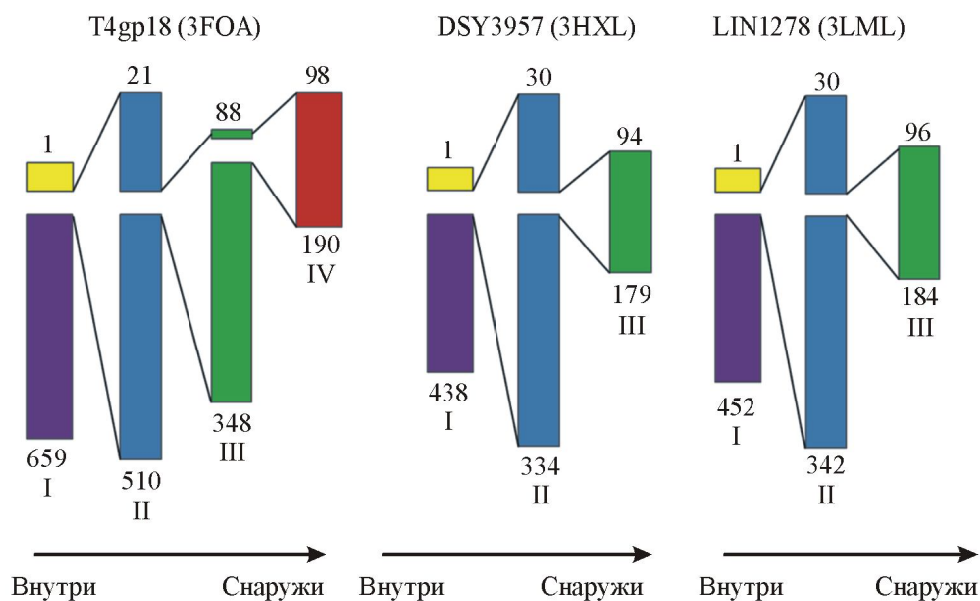
структурные белки фагов без нарушения правильной сборки соответствующих элементов вириона довольно сложно. Однако указанием на эту возможность служит наличие на этих белках переменных Ig-подобных доменов. Эти домены встречаются в белках всех трех семейств порядка *Caudovirales*, и они всегда экспонированы на поверхности [58]. Возможно, так же как и в случае пг *hoc* фага T4, функции этих доменов состоят во взаимодействии с внешними лигандами, например, с дополнительными рецепторами на поверхности бактерий хозяев, о чем косвенно свидетельствует ассоциация белков с Ig-доменами, в метагеномах фаговых сообществ кишечника человека с генерирующими изменчивость ретронными элементами (DGRE), которые обеспечивают ускоренную адаптацию фагов к меняющимся условиям среды [59]. Основные типы фаговых белков, в которых обнаружены Ig-подобные элементы, приведены на рис. 3.

По-видимому, наличие подобных доменов при их терминальном расположении указывает на то, что соответствующий конец полипептидной цепи не участвует в белок—белковых взаимодействиях в составе фаговой частицы и экспонирован во внешнюю среду, т.е. потенциально может использоваться для размещения дополнительных пептидных последовательностей.

Помимо белков, содержащих Ig-подобные домены, некоторые фаги, в основном принадлежа-

щие семейству *Podoviridae*, несут рецептор-узнающие белки, образующие подобие жесткого венчика из 6 или 12 шипов вокруг портовой вершины капсида [60]. В отдельных случаях размещение дополнительных доменов на дистальном С-конце таких шипов может сочетаться с сохранением жизнеспособности фага (оговоримся, что при некоторых схемах получения ВПЧ жизнеспособность фага может не быть обязательной). При использовании таких белков для создания слитых производных с целевыми антигенами следует иметь в виду возможные стерические затруднения в формировании ВПЧ, вызываемые тем, что такие белки, как правило, формируют в составе вирусной частицы параллельные гомотримеры.

Помимо конструкций с автономно собирающимися белками капсида, которые были рассмотрены выше, получение химерных белков возможно и на основе субъединиц цилиндрической части фагового хвоста. Это могут быть белки трубки фагов семейства *Siphoviridae* (возможно также и *Muoviridae*) либо белки сократимых хвостов *Muoviridae* [61—63]. Интересно отметить, что белок V фага  $\lambda$  (ответственный за формирование трубки хвоста) несет на своем С-конце Ig-подобный домен, делеция которого не вызывает нарушения полимеризации трубки [62]. При этом, однако, малый размер субъединиц пг V (без Ig-подобного домена около 100 аминокислотных остатков) может вызвать затруднения при дисплее крупных белков [64].



**Рис. 4.** Доменная структура белков сократимого чехла трех бактериофагов. В скобках даны номера записей в базе структур PDB. Цифры обозначают номера ключевых аминокислотных остатков [63]

**Fig. 4.** Domain organization of three phage contractile sheath proteins. The PDB accession numbers are given in parenthesis, the numbers indicate the key a.a. residues coordinates [63].

Белки сократимых чехлов хвостов большинства фагов невозможно использовать для экспонирования терминально расположенных пептидов, так как N- и C-концевые домены этих молекул вовлечены в межсубъединичные контакты чехла. При этом многие такие белки, как, например, пг 18 фага T4, при экспрессии соответствующих генов в гетерологичных системах подвергаются очень эффективной сборке в поличехлы. Потребовались достаточно серьезные усилия, прежде чем были получены мутанты пг 18, сохраняющие растворимость, но не образующие поличехлы, что дало возможность получить кристаллы данного белка и расшифровать его пространственную структуру [63].

Анализ опубликованных структур нескольких белков чехлов бактериофагов привел Шнейдера и Леймана [63] к заключению, что в некоторых таких белках присутствует дополнительный домен IV, встроенный внутрь домена III, который расположен с внешней стороны чехла и, по-видимому, не принимает прямого участия в формировании межсубъединичных контактов (рис. 4.).

Использование чехольных белков бактериофагов в качестве основы для создания ВПЧ весьма привлекательно, так как поличехол — это достаточно крупная структура, которая может нести экспонированные и регулярно расположенные довольно крупные белковые антигены. Однако в каж-

дом случае может потребоваться достаточно много проб и ошибок, прежде чем будет подобран такой дизайн химерной конструкции, в котором помещенная внутрь последовательность несущего белка чужеродного полипептида не будет интерферировать с фолдингом и образованием поличехлов.

Таким образом, анализ опубликованной к настоящему моменту литературы позволяет сделать вывод, что использование ВПЧ, созданных на основе бактериофагов или их полимеризующихся структурных белков, представляет собой перспективный подход к созданию вакцинных субстанций. В то же время, молекулярная масса протективного антигена возбудителя сибирской язвы близка к предельно допустимому размеру для таких систем, а во многих случаях, по-видимому, превышает его. Одним из возможных способов преодоления этого затруднения является использование отдельных доменов, обеспечивающих развитие достаточной силы протективного иммунного ответа, либо конструирование на основе РА усеченных искусственных белков меньшего размера, несущих основные нейтрализующие эпитопы молекулы антигена [65]. Другим возможным решением может быть конструирование бинарных систем, в которых ВПЧ несет относительно небольшой домен, способный эффективно связываться либо с РА, либо с химерным белком на его основе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках соглашения № 14.607.21.0093 от 28.11.2014 г., уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60714X0093.

The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF within the frames of the Agreement no. 14.607.21.0093 (October 28, 2014), Unique Identifier of the Agreement RFMEFI60714X0093.

Получено 01.02.16

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Киселев О.И.* Результаты клинического исследования реактогенности, безопасности и иммуногенности вакцины Грифор® на пожилom контингенте от 60 лет и старше / О.И. Киселев, С.А. Коровкин, А.Н. Миронов, С.Я. Мельников, Н.В. Дылдина, М.К. Ерофеева, А.А. Соминина, Е.М. Войцеховская, М.А. Стукова // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. — 2008. — Т. 41(4). — С. 36—39.  
*Kiselev, O.I.* Results of preclinical investigations in reactogenicity, safety and immunogenicity of Greenfor® vaccine on aged contingent, 60 years old and over / O.I. Kiselev, S.A. Korovkin, A.N. Mironov, S.Ya. Mel'nikov, N.V. Dyldina, M.K. Erofeeva, A.A. Sominina, E.M. Voytsekhovskaya, and M.A. Stukova // *Epidemiologiya i Vaksinoprofilaktika (Epidemiology and Vaccine Prophylaxis)*. — 2008. — V. 41(4). — P. 36—39.
2. *Лозовой Д.А., Михалишин В.В., Михалишин Д.В., Стариков В.А., Лёзова Т.Н., Борисов А.В., Юрчишин В.Д., Смоленский В.И., Уласов В.И.* Вакцина против ящура типа А инактивированная сорбированная // Патент РФ № 2526570, А 61 К 39/135, С 12 N 7/00. 2014.  
*Lozovoy, D.A., Mikhailishin, V.V., Mikhailishin, D.V., Starikov, V.A., Liozova, T.N., Borisov, A.V., Yurchishin, V.D., Smolenskii, V.I., and Ulasov, V.I.* Inactivated adsorbed vaccine against foot and mouth disease type A // Patent RF 2526570, A 61 K 39/135, C 12 N 7/00. 2014.
3. *Микшис Н.И., Попов Ю.А., Дроздов И.Г., Кутырев В.В.* Штамм *Bacillus anthracis* KM92 — продуцент сибиреязвенных антигенов // Патент РФ № 2180916, С 12 N 1/20 А 61 К 39/07. 2001.  
*Mikshis, N.I., Popov, Yu.A., Drozdov, I.G., and Kutyrev, V.V.* A *Bacillus anthracis* KM92 strain, a producer of anthrax antigens // Patent RF 2180916, C 12 N 1/20 A 61 K 39/07. 2001.
4. *Садовой Н.В., Кравец И.Д., Селиваненко Г.М., Харечко Г.С., Садовая Е.А., Васильев П.Г., Литусов Н.В., Елагин Г.Д., Супотницкий М.В.* Вакцина сибиреязвенная комбинированная // Патент РФ № 2115433, А61К39/07, А61К39/40. 1998.  
*Sadovoy, N.V., Kravets, I.D., Selivanenko, G.M., Kharechko, G.S., Sadovaya, E.A., Vasiliev, P.G., Litusov, N.V., Elagin, G.D., and Supotnitskii, M.V.* Anthrax combined vaccine // Patent RF 2115433, A61K39/07, A61K39/40. 1998.
5. *Blokhina, E.A.* A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HBc virus-like particles / E.A. Blokhina, V.V. Kuprianov, L.M. Tsybalova, O.I. Kiselev, N.V. Ravin, K.G. Skryabin // *Virology*. — 2013. — V. 435. — P. 293—300.
6. *Chroboczek, J.* Virus-like particles as vaccine / J. Chroboczek, I. Szurgot, E. Szolajska // *Acta Biochim. Pol.* — 2014. — V.61(3). — P. 531—539.
7. *Bennett, K.M.* Hybrid flagellin as a T cell independent vaccine scaffold / K.M. Bennett, R.D., Jr. Gorham, V. Gusti, L. Trinh, D. Morikis, D.D. Lo // *BMC Biotechnol.* — 2015. — V. 15. — P. 71.
8. *Lim, J.S.* Direct Regulation of TLR5 Expression by Caveolin-1 / J.S. Lim, K.C. Nguyen, J.M. Han, I.S. Jang, C. Fabian, K.A. Cho // *Mol. Cells*. — 2015. — V. 38. — P. 1111—1117.
9. *Гинцбург А.Л.* Инновационные аспекты разработки нановакцин и диагностических тест-систем / А.Л. Гинцбург, В.Г. Лунин, А.С. Карягина-Жулина // *Инновации*. — 2007. — № 12. — С. 62—67.  
*Ginzburg, A.L.* Innovation aspects of design of nanovaccines and diagnostic test systems // A.L. Ginzburg, V.G. Lunin, A.S. Kariagina-Zhulina // *Innovations*. — 2007. — N 12. — P. 62—67.
10. *Garlapati, S.* Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis / S. Garlapati, N.F. Eng, T.G. Kiro, J. Kindrachuk, G.K. Mutwiri, R.E. Hancock, S.A. Halperin, A.A. Potter, L.A. Babiuk, V. Gerdtts // *Vaccine*. — 2011. — V.29(38). — P. 6540—6548.
11. *Czyż, M.* Stability of S-HBsAg in long-term stored lyophilised plant tissue / M. Czyż, R. Dembczynski, R. Marecik, T. Pniowski // *Biologicals*. — 2016. pii: S1045-1056(15)00137-2.
12. *Zahid, M.* Assessing stability and assembly of the hepatitis B surface antigen into virus-like particles during down-stream processing / M. Zahid, H. Lünsdorf, U. Rinas // *Vaccine*. — 2015. — V.33(31). — P. 3739—3745.
13. *Scheller, E.V.* Bordetella filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential / E.V. Scheller, P.A. Cotter // *Pathol. Dis.* — 2015. — V. 73(8). — P. ftv079.
14. *Zhang, X.* Robust manufacturing and comprehensive characterization of recombinant hepatitis E virus-like particles in Hecolin® / X. Zhang, M. Wei, H. Pan, Z. Lin, K. Wang, Z. Weng, Y. Zhu, L. Xin, J. Zhang, S. Li, N. Xia, Q. Zhao // *Vaccine*. — 2014. — V. 32(32). — P. 4039—4050.
15. *Proffitt, A.* First HEV vaccine approved // *Nature Biotechnol.* — 2012. — V. 30(4). — P. 300—301.
16. *Park, S.B.* Hepatitis E vaccine debuts // *Nature*. — 2012. — V. 491(7422). — P. 21—22.
17. *Zeltins, A.* Construction and characterization of virus-like particles: a review // *Mol. Biotechnol.* — 2013. — V. 53(1). — P. 92—107.
18. *Lagoutte, P.* Scalable chromatography-based purification of virus-like particle carrier for epitope based influenza A vaccine produced in *Escherichia coli* / P. Lagoutte, C. Mignon,

- S. Donnat, G. Stadthagen, J. Mast, R. Sodoyer, A. Lugari, B. Werle // *J. Virol. Meth.* — 2016. — V. 232(8). — P. 11—15.
19. *Mullaney, J.M.* Bacteriophage T4 capsid packaging and un-packaging of DNA and proteins / J.M. Mullaney, L.W. Black // *Meth. Mol. Biol.* — 2014. — V. 1108. — P. 69—85.
  20. *Mairhofer, J.* Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions / J. Mairhofer, T. Scharl, K. Marisch, M. Cserjan-Puschmann, G. Striedner // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2013. — V. 79(12). — P. 3802—3812.
  21. *Ebrahimizadeh, W.* Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application / W. Ebrahimizadeh, M. Rajabibazl // *Curr. Microbiol.* — 2014. — V. 69(2). — P. 109—120.
  22. *Rakonjac, J.* Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications / J. Rakonjac, N.J. Bennett, J. Spagnuolo, D. Gagic, M. Russel // *Curr. Issues. Mol. Biol.* — 2011. — V. 13(2). — P. 51—76.
  23. *Marvin, D.A.* Structure and assembly of filamentous bacteriophages / D.A. Marvin, M.F. Symmons, S.K. Straus // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 2014. — V. 114(2). — P. 80—122.
  24. *Taufik, I.* Monitoring the activity of single translocons / I. Taufik, A. Kedrov, M. Exterkate, A.J. Driessen // *J. Mol. Biol.* — 2013. — V. 425(22). — P. 4145—4153.
  25. *Danner, S.* T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries / S. Danner, J.G. Belasco // *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* — 2011. — V. 98(23). — P. 12954—12959.
  26. *Oh, B.* The delta domain of the HK97 major capsid protein is essential for assembly / B. Oh, C.L. Moyer, R.W. Hendrix, R.L. Duda // *Virology.* — 2014. — V. 456. — P. 71—78.
  27. *Gan, L.* Capsid conformational sampling in HK97 maturation visualized by X-ray crystallography and cryo-EM / L. Gan, J.A. Speir, J.F. Conway, G. Lander, N. Cheng, B.A. Firek, R.W. Hendrix, R.L. Duda, L. Liljas, J.E. Johnson // *Structure.* — 2006. — V. 14(11). — P. 1655—1665.
  28. *Wikoff, W.R.* Time-resolved molecular dynamics of bacteriophage HK97 capsid maturation interpreted by electron cryo-microscopy and X-ray crystallography / W.R. Wikoff, J.F. Conway, J. Tang, K.K. Lee, L. Gan, N. Cheng, R.L. Duda, R.W. Hendrix, A.C. Steven, J.E. Johnson // *J. Struct. Biol.* — 2006. — V.153(3). — P. 300—306.
  29. *Fokine, A.* Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages / A. Fokine, M.G. Rossmann // *Bacteriophage.* — 2014. — V. 4(1). — e28281.
  30. *Fokine, A.* Structure of the three N-terminal immunoglobulin domains of the highly immunogenic outer capsid protein from a T4-like bacteriophage / A. Fokine, M.Z. Islam, Z. Zhang, V.D. Bowman, V.B. Rao, M.G. Rossmann // *J. Virol.* — 2011. — V. 85(16). — P. 8141—8148.
  31. *Barr, J.J.* Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity / J.J. Barr, R. Auro, M. Furlan, K.L. Whiteson, M.L. Erb, J. Pogliano, A. Stotland, R. Wolkowicz, A.S. Cutting, K.S. Doran, P. Salamon, M. Youle, F. Rohwer // *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* — 2013. — V. 110(26). — P. 10771—10776.
  32. *Zivanovic, Y.* Insights into bacteriophage T5 structure from analysis of its morphogenesis genes and protein components / Y. Zivanovic, F. Confalonieri, L. Ponchon, R. Lurz, M. Chami, A. Flayhan, M. Renouard, A. Huet, P. Decottignies, A.R. Davidson, C. Breyton, P. Boulanger // *J. Virol.* — 2014. — V.88(2). — P.1162—1174.
  33. *Huet, A.* In vitro assembly of the T=13 procapsid of bacteriophage T5 with its scaffolding domain / A. Huet, J.F. Conway, L. Letellier, P. Boulanger // *J. Virol.* — 2010. — V. 84(18). — P. 9350—9358.
  34. *Huet, A.* Correct Assembly of the Bacteriophage T5 Procapsid Requires Both the Maturation Protease and the Portal Complex / A. Huet, R.L. Duda, R.W. Hendrix, P. Boulanger, J.F. Conway // *J. Mol. Biol.* — 2016. — V. 428(1). — P. 165—181.
  35. *Preux, O.* A two-state cooperative expansion converts the procapsid shell of bacteriophage T5 into a highly stable capsid isomorphous to the final virion head / O. Preux, D. Durand, A. Huet, J.F. Conway, A. Bertin, C. Boulogne, J. Drouin-Wahbi, D. Trevarin, J. Pe'rez, P. Vachette, P. Boulanger // *J. Mol. Biol.* — 2013. — V. 425(11). — P. 1999—2014.
  36. *Chang, J.R.* Assembly of bacteriophage P2 capsids from capsid protein fused to internal scaffolding protein / J.R. Chang, M.S. Spilman, T. Dokland // *Virus Genes.* — 2010. — V. 40(2). — P. 298—306.
  37. *Berche, P.* Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2012. — V. 18(5). — P. 1—6.
  38. *Liu, S.* Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis / S. Liu, M. Moayeri, S.H. Leppla // *Trends Microbiol.* — 2014. — V. 22(6). — P. 317—325.
  39. *Zakowska, D.* New aspects of the infection mechanisms of *Bacillus anthracis* / D. Zakowska, M. Bartoszcze, M. Niemcewicz, A. Bielawska-Drozd, J. Kocik // *Ann. Agric. Environ. Med.* — 2012. — V. 19(4). — P. 613—618.
  40. *Wang, H.C.* Potentiation of anthrax vaccines using protective antigen-expressing viral replicon vectors / H.C. Wang, H.J. An, Y.Z. Yu, Q. Xu // *Immunol. Lett.* — 2014. — pii. S0165-2478(14)00152-7.
  41. *Liu, S.* The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin / S. Liu, Y. Zhang, B. Hoover, S.H. Leppla // *Toxins (Basel).* — 2012. — V. 5(1). — P. 1—8.
  42. *Lowe, D.E.* Cellular and physiological effects of anthrax exotoxin and its relevance to disease / D.E. Lowe, I.J. Glomski // *Front. Cell Infect. Microbiol.* — 2012. — N2. — P. 76—82.
  43. *Dhasmana, N.* Recent Developments in Anti-dotes Against Anthrax / N. Dhasmana, L.K. Singh, A. Bhaduri, R. Misra, Y. Singh // *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* — 2014. — V. 9(2). — P. 83—96.
  44. *Kaur, M.* Anthrax vaccines: present status and future prospects / M. Kaur, S. Singh, R. Bhatnagar // *Vaccines.* — 2013. — V. 12(8). — P. 955—970.
  45. *Garman, L.* Protective antigen-specific memory B cells persist years after anthrax vaccination and correlate with humoral immunity / L. Garman, K. Smith, A.D. Farris, M.R. Ne-

- Ison, R.J. Engler, J.A. James // *Toxins* (Basel). — 2014. — V.6(8). — P. 2424—2431.
46. *Petosa, C.* Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen / C. Petosa, R.J. Collier, K.R. Klimpel, S.H. Leppla, R.C. Liddington // *Nature*. — 1997. — V. 385(6619). — P. 833—838.
  47. *Feld, G.K.* Structural basis for the unfolding of anthrax lethal factor by protective antigen oligomers / G.K. Feld, K.L. Thoren, A.F. Kintzer, H.J. Sterling, I.I. Tang, S.G. Greenberg, E.R. Williams, B.A. Krantz // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2007. — V. 17(11). — P. 1383—1390.
  48. *Santelli, E.* Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor / E. Santelli, L.A. Bankston, S.H. Leppla, R.C. Liddington // *Nature*. — 2004. — V. 430(7002). — P.905—908.
  49. *Rezaee, M.* Cloning, expression and purification of binding domains of lethal factor and protective antigen of *Bacillus anthracis* in *Escherichia coli* and evaluation of their related murine antibody / M. Rezaee, H. Honari, M.R. Kooshk // *Mol. Biol. Rep.* — 2014. — V. 41(4). — P. 2445—2452.
  50. *Ma, Y.* In vitro and in vivo activities of recombinant anthrax protective antigen co-expressed with thioredoxin in *Escherichia coli* / Y. Ma, Y.Z. Yu, Y.F. Zhu, Q. Xu, Z.W. Sun // *Hum. Vaccin. Immunother.* — 2013. — V. 9(11). — P. 2371—2377.
  51. *Abboud, N.* Immunogenicity of *Bacillus anthracis* protective antigen domains and efficacy of elicited antibody responses depend on host genetic background / N. Abboud, A. Casadevall // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2008. — V. 15(7). — P. 1115—1123.
  52. *Reason, D.C.* Domain specificity of the human antibody response to *Bacillus anthracis* protective antigen / D.C. Reason, A. Ullal, J. Liberato, J. Sun, W. Keitel, J. Zhou // *Vaccine*. — 2008. — V. 26(32). — P. 4041—4047.
  53. *Тедиков В.М.* Клонирование и экспрессия детерминанты протективного антигена *Bacillus anthracis* в клетках *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus anthracis* / В.М. Тедиков, А.П. Добрица // *Молекул. генет., микробиол. вирусол.* — 1993. — № 2. — С. 13—16.  
*Tedikov, V.M.* Cloning and expression of determinant *Bacillus anthracis* in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis* cells / V.M. Tedikov, and A.P. Dobrytsa // *Молекулярная Генетика, Микробиология и Вирусология* (Molecular Genetics, Microbiology and Virology). — 1993. — N 2. — P. 13—16.
  54. *Микшис Н.И., Попов Ю.А., Шулепов Д.В.* Аспорогенный рекомбинантный штамм *Bacillus anthracis* 55deltaТ-ПА-1Spо (pUB110PA-1) — продуцент протективного антигена сибиреязвенного микроба // Патент РФ № 2321629, C12N1/21, C12P21/00, C12R1/07. 2008.  
*Mikshis, N.I., Popov, Yu.A., and Shulepov, D.V.* Asporogenic recombinant *Bacillus anthracis* 55deltaТПА-1Spо (pUB110PA-1) strain, a producer of protective antigen of anthrax cause // Patent RF 2321629, C12N1/21, C12P21/00, C12R1/07. 2008.
  55. *Manayani, D.J.* A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine / D.J. Manayani, D. Thomas, K.A. Dryden, V. Reddy, M.E. Siladi, J.M. Marlett, G.J. Rainey, M.E. Pique, H.M. Scobie, M. Yeager, J.A. Young, M. Manchester, A. Schneemann // *PLoS Pathog.* — 2007. — V. 3(10). — P. 1422—1431.
  56. *Shivachandra, S.B.* Multicomponent anthrax toxin display and delivery using bacteriophage T4 / S.B. Shivachandra, Q. Li, K.K. Peachman, G.R. Matyas, S.H. Leppla, C.R. Alving, M. Rao, V.B. Rao // *Vaccine*. — 2007. — V. 25(7). — P. 1225—1235.
  57. *Gamkrelidze, M.* T4 bacteriophage as a phage display platform / M. Gamkrelidze, K. Dñebrowska // *Arch. Microbiol.* — 2014. — V. 196(7). — P. 473—479.
  58. *Fraser, J.S.* Ig-like domains on bacteriophages: a tale of promiscuity and deceit / J.S. Fraser, Z. Yu, K.L. Maxwell, A.R. Davidson // *J. Mol. Biol.* — 2006. — V. 359(2). — P. 496—507.
  59. *Minot, S.* Hypervariable loci in the human gut virome / S. Minot, S. Grunberg, G.D. Wu, J.D. Lewis, F.D. Bushman // *Proc. Natl. Acad. Sci US.* — 2012. — V. 109(10). — P. 3962—3966.
  60. *Casjens, S.R.* Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses / S.R. Casjens, I.J. Molineux // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2012. — V.726. — P. 143—179.
  61. *Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харченко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В., Кожухов В.В.* Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. — М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. — С. 447.  
*Onishchenko, G.G., Vasiliev, N.T., Litusov, N.V., Kharchenko, A.T., Vasiliev, P.G., Sadovoy, N.V., and Kozhukhov, V.V.* Anthrax: actual aspects of microbiology, epidemiology, clinics, diagnosis, therapy and prophylaxis. — Moscow: VUNMTs MZ RF, 1999. — P. 447.
  62. *Davidson, A.R.* Long noncontractile tail machines of bacteriophages / A.R. Davidson, L. Cardarelli, L.G. Pell, D.R. Radford, K.L. Maxwell // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2012. — V. 726. — P. 115—142.
  63. *Leiman, P.G.* Contractile tail machines of bacteriophages // P.G. Leiman, M.M. Shneider // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2012. — V. 726. — P. 93—114.
  64. *Ivins, B., Worsham, P., Friedlander, A., Farchaus, J., Welkos, S.* Method of making a vaccine // Patent US 20020034512, C 12 R 1/07, C 12 N 15/75. 2002.
  65. *Abboud, N.* Identification of linear epitopes in *Bacillus anthracis* protective antigen bound by neutralizing antibodies / N. Abboud, M. De Lesus, A. Nakouzi, R.J. Cordero, M. Pujato, A. Fiser, J. Rivera, A. Casadevall // *J. Biol. Chem.* — 2009. — V. 284(37). — 25077—25086.

A.V. LETAROV<sup>1,\*</sup>, Yu.K. BIRIUKOVA<sup>2</sup>, A.S. EPREMYAN<sup>3</sup>,  
and A.B. SHEVELEV<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> The Research Center Fundamental Bases of Biotechnology,  
119071, Moscow Russia

<sup>2</sup> The Chumakov Institute of Poliomyelitis and Virus Encephali-  
tis, 142782, Moscow Russia

<sup>3</sup> The Research-Industrial Center Armibiotechnology, 0056, Ere-  
van Armenia

<sup>4</sup> Innotech-21, Limited liability Company, 140000, Liubertsy,  
Moscovskaya oblast Russia

*e-mail:* letarov@gmail.com

### Prospects of the Use of Bacteriophage- based Virus-like Particles in the Creation of Vaccines to Anthrax

The profitability of the vaccine production is less than  
that of other pharmaceutical goods worldwide. By this reason,  
self-cost of the vaccine substance determines consumption-avail-

able vaccine range. This is of particular importance for veterina-  
ry vaccines. In this review, we have surveyed the published data  
about exploited vaccines and concluded that immunogenicity of  
antigen substances based on whole virions is higher than that of  
soluble antigens. The physiological basis of this phenomenon re-  
mains unknown; however it can explain why most of the descri-  
bed recombinant vaccines have not yet been put into practice. All  
practically implemented anti-viral vaccines except the vaccine to  
hepatitis B are based on viral substances produced by conventio-  
nal cultural technologies. Taking into account this observation, an  
approach to the development of a universal platform for recombi-  
nant vaccines producing in the form of virus-like particles is sug-  
gested. To this end, a technique of designing fused bi-functional  
derivatives of bacteriophage proteins containing antigens of inter-  
est should be involved. The approach is depicted using the pro-  
tective antigen of anthrax, a conventional vaccine antigen.

*Key words:* anthrax, *Bacillus anthracis*, bacteriophages,  
biotechnology, display, protective antigen, recombinant vacci-  
nes, virus-like particles.

*Biotehnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 2, P. 43—56.*

---

\*Author for correspondence.