

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) ДЛЯ САМОСБОРКИ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ БАКТЕРИОФАГА MS2

© 2022 г. Л. Н. Борщевская¹, *, Т. Л. Гордеева¹, Е. Б. Пичкур¹,
В. Р. Самыгина^{1,2}, С. П. Синеокий¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук, Москва, 119333 Россия

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 19.10.2022 г.

Принята к публикации 21.10.2022 г.

Показана успешная самосборка вирусоподобных частиц (ВПЧ) бактериофага MS2 из секретируемого рекомбинантного капсидного белка в культуральной жидкости метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii*. Выход ВПЧ составил 5 г/л и достигал 30% от общего белка супернатанта культуральной жидкости. ВПЧ представляли собой хорошо упорядоченные частицы диаметром 26–28 нм, имеющие икосаэдрическую форму, что было подтверждено методом просвечивающей электронной микроскопии. Предложена упрощенная схема выделения и очистки образцов ВПЧ, которая обеспечивает более чем 90%-ную чистоту целевых белковых структур. Полученные результаты могут быть использованы для разработки технологии масштабного производства рекомбинантных вакцин на платформе ВПЧ бактериофага MS2.

Ключевые слова: вирусоподобные частицы, самосборка, бактериофаг MS2, капсидный белок, дрожжевая экспрессионная система, *Komagataella phaffii*, *Pichia pastoris*

DOI: 10.56304/S0234275822060047

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) представляют собой мультимерные наноструктуры размером 20–200 нм, состоящие из белков вирусного капсида, которые спонтанно собираются при экспрессии в рекомбинантных системах. Эти структуры имитируют организацию и конформацию нативных вирусов, но лишены собственного геномного материала, что исключает любую возможность реверсивных мутаций или патогенной инфекции. ВПЧ используют для создания вакцин – организм воспринимает их как патоген, что приводит к формированию клеточного и гуморального иммунного ответа.

В настоящее время на основе ВПЧ уже разработаны и успешно коммерциализированы вакцины против вируса гепатита В и вируса папилломы человека [1, 2].

ВПЧ могут быть построены из белков одного вируса или представлять химерные частицы, где на платформе ВПЧ одного вируса представлены

белки или пептиды, полученные из другого организма. Химерные ВПЧ включают чужеродные антигены, в том числе консервативные эпитопы для выработки широконейтрализующих антител. Успешное включение эпитопа в ВПЧ гарантирует, что антиген будет отображаться в той же структурной среде и с высокой плотностью на поверхности частицы.

В ряде исследований продемонстрирована эффективность использования вакцин на основе химерных ВПЧ как метод усиления иммунного ответа на различные молекулы, включая эпитопы патогенов, химические агенты и даже аутоантигены [3, 4].

Помимо пептидов или других биологически активных молекул, экспонированных на поверхности, ВПЧ могут содержать инкапсулированные белки, нуклеиновые кислоты или другие молекулы. Таким образом, ВПЧ рассматривают как средства направленной доставки веществ в определенные клетки, ткани или органы, где происходит высвобождение встроенных, прикрепленных или инкапсулированных в них элементов [5]. Так,

Список сокращений: ВПЧ – вирусоподобные частицы; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

ВПЧ были использованы для селективной доставки химиотерапевтических препаратов, коктейлей коротких интерферирующих РНК (siРНК) и белковых токсинов в опухолевые клетки [6, 7].

Несколько групп исследователей изучали возможность использования ВПЧ, созданных на основе бактериофагов. Бактериофаги считаются перспективными кандидатами для разработки вакцин на ВПЧ-платформе, благодаря их размеру, структуре поверхности, безопасности, стабильности, биоразлагаемости и низкой стоимости производства [8–11]. Кроме того, ВПЧ, полученные на основе бактериофагов, сами по себе способны стимулировать врожденный иммунный ответ, потенциально действуя как естественные адъюванты, что считается важным критерием эффективности эпителиальных вакцин.

Показано, что на основе ВПЧ бактериофагов возможно создание вакцин от сибирской язвы, чумы, ВИЧ, вируса ящура [12].

Одним из перспективных кандидатов в качестве платформы для разработки рекомбинантных вакцин считается бактериофаг MS2, ВПЧ которого могут быть использованы в качестве каркаса для создания эпителиальных вакцин, РНК-вакцин, средств направленной доставки генов и лекарственных средств [13, 14].

Бактериофаг MS2, относящийся к роду *Levivirus*, способен размножаться на клетках *Escherichia coli* K12 F+. Геном бактериофага представлен одноцепочечной РНК размером 3 534 нуклеотида и состоит из четырех генов. Единственным капсидным белком бактериофага является белок CP, представляющий собой гомодимер, который формирует икосаэдрическую частицу диаметром 27 нм, состоящую из 90 димеров. Важная особенность белка CP MS2 – способность к самосборке в неинфекционные ВПЧ в отсутствие вирусной РНК. Показано, что ВПЧ бактериофага MS2 могут быть получены в клетках *E. coli* при экспрессии гена, кодирующего белок CP, при этом выход целевого белка составляет до половины общего растворимого белка и ВПЧ могут быть очищены в одну хроматографическую стадию [15].

Важно заметить, что при разработке вакцин нежелательно использовать экспрессионные системы *E. coli* во избежание контаминации бактериальными эндотоксинами. Кроме того, использование *E. coli* в качестве хозяина не всегда желательно из-за неправильной укладки рекомбинантного белка и образования телец включения [16]. Также бактерии не подходят для синтеза эпителиальных эукариотических белков из-за отсутствия в их клетках аппарата посттрансляционного гликозилирования [17].

Дрожжевые экспрессионные системы лишены этих недостатков, поэтому считаются альтернативой для продуцирования ВПЧ. В настоящее

время около 20% описанных ВПЧ получено в дрожжевых экспрессионных системах [18]. Так, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* были использованы для внутриклеточной самосборки ВПЧ бактериофагов, однако выход целевого продукта был достаточно низким – не превышал 30% от продукции в клетках *E. coli* [19].

Цель работы – исследование возможности и эффективности внеклеточной самосборки ВПЧ бактериофага MS2 из рекомбинантного капсидного белка, секретируемого в культуральную жидкость, в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *Komagataella pfaffii*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, питательные среды, плазмиды

Для генно-инженерных работ и размножения бактериофага MS2 был использован штамм *E. coli* XL1-Blue (*endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac hsdR17 F' [proAB lacIqZΔM15 Tn10]*) ВКПМ В-9838.

Штамм дрожжей *K. phaffii* ВКПМ У-4287 и бактериофаг MS2 ВКПМ Ph-1505 были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Россия).

Для культивирования *E. coli* использовали среду LB: 0.5% дрожжевой экстракт (“Диаэм”, Россия), 1% триптон (“Диаэм”), 1% NaCl (“Химмед”, Россия); для культивирования *K. phaffii* – среда YPD: 1% дрожжевой экстракт (“Диаэм”), 1.5% триптон (“Диаэм”), 2% глюкоза (“Химмед”).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использована программа BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для поиска сайтов гликозилирования использовали сервер NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Клонирование гена, кодирующего белок CP бактериофага MS2, и создание экспрессионной плазмиды

Бактериофаг MS2 растили до титра 3×10^9 частиц/мл на клетках *E. coli* XL1-Blue методом лизатов на чашках [20]. РНК бактериофага MS2 выделяли с использованием комплекта реагентов S-Сорб (“Синтол”, Россия). Для получения кДНК использован набор MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) и праймер 5'-TTAGTAGATTCCGGAGTTTGCTGC-3'.

Аmplификацию гена, кодирующего CP, проводили методом ПЦР с использованием кДНК бактериофага MS2 в качестве матрицы и специфических праймеров: MS2-f 5'-ATGGCTTCTA-

АСТТТАСТСАГТТТС-3' и MS2-г 5'-ТТАГТАГАТ-ТСССГГАГТТТГСТГС-3'.

Сайтспецифический мутагенез проводили методом ПЦР с использованием праймеров: MS-N5'-АГААТТСАТГГСТТСТСАТТТАСТСАГТТТС-3' и MS4 5'-ААГССГСССГСТТАГТАГАТТСССГГАГТТТГСТГС-3'. Выделение и очистку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора GeneJET Gel Extractin Kit (#КО692; Thermo Fisher Scientific, США).

Фрагмент ДНК, кодирующий белок СР бактериофага MS2, клонировали в состав экспрессионного вектора рPICZαА, в результате чего получили рекомбинантную экспрессионную плазмиду рPIC-СР.

Все генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) проводили по общепринятым методикам [21].

Конструирование рекомбинантных штаммов K. phaffii

Плазмида рPIC-СР была линейаризована с использованием рестриктаз *EcoRV* и *BglII* и трансформирована в клетки штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 методом электропорации.

Селекцию трансформантов вели на агаризованной среде YPD в течение 5 сут при температуре 30°C. В качестве селективного агента использовали антибиотик зеоцин (Invitrogen, США) в концентрации 0.1 мг/мл.

Отбор наиболее продуктивных штаммов

Культивирование трансформантов проводили в минимальной питательной среде YNB (Himedia, Индия) с добавлением метанола (3 мас. %) в 96-луночных планшетах для культивирования (Greiner Bio-One, Германия) при 30°C в течение 72 ч на качалке (250 об/мин). В качестве контроля использовали штамм *K. phaffii* Y-4287.

Отбор наиболее продуктивных трансформантов проводили путем количественного определения белка в растворе. В каждую лунку планшета помещали 25 мкл культуральной жидкости, полученной при культивировании исследуемых трансформантов, и вносили 25 мкл раствора Бредфорда. Оптическую плотность измеряли при длине волны 595 нм на спектрофотометре Versamax reader (Molecular Devices, США). В результате был отобран наиболее продуктивный штамм — *K. phaffii* Y-4287/pPIC-СР2.

Ферментация рекомбинантного штамма K. phaffii Y-4287/pPIC-СР2

Для получения инокулята штамм растили в течение 24 ч при 28°C и аэрации 250 об/мин в жидкой питательной среде YPD. Полученным инокулятом засеивали колбы со средой YP (50 мл): 1% дрожжевой экстракт, 1.5% триптон, 1% глицерин — в соотношении 1 : 10 и растили при 28°C и аэрации 250 об/мин в течение 96 ч. Через каждые 24 ч культивирования добавляли 1% метанола. После окончания ферментации клетки отделяли центрифугированием и анализировали белковый состав супернатанта культуральной жидкости.

Очистка белков

Первичную очистку белков супернатанта культуральной жидкости проводили методом преципитации полиэтиленгликолем (ПЭГ). Для этого к супернатанту культуральной жидкости добавляли ПЭГ 6000 (Serva, Германия) до конечной концентрации 10% и NaCl (“Химмед”) до конечной концентрации 0.5 М, инкубировали 12 ч при 4°C, после чего центрифугировали 20 мин при 13000 g при 4°C. Осадок растворяли в 0.1 М Tris-HCl (pH 6.8).

Белки очищали методом гель-фильтрации на колонке Sepharose CL-4В (Pharmacia, Швеция) (H = 60 см, V = 75 мл) со скоростью элюирования 3 мл/мин при 4°C.

Концентрирование белков проводили методом ультрафильтрации с использованием колонок VIVASPIN 500 (Sartorius, Великобритания) через мембрану с отсекающим размером пор 50 кДа.

Анализ белков в агарозном геле

Электрофорез в неденатурирующих условиях проводили в 1%-ном агарозном геле в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0, при 18 В/75 мА в течение ночи, после чего гель окрашивали 0.1%-ным раствором Кумасси R250 (“Диаэм”) для обнаружения белков.

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-ПААГ)

Белковый электрофорез в денатурирующих условиях проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США) 1 ч при напряжении 50 В, затем 2–3 ч при напряжении 150 В. Белки окрашивали с использованием набора Silver Stain Plus (Bio-Rad Laboratories). Чистоту и количество целевых белков оценивали денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageJ 1.50b (<https://imagej.nih.gov/>).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Образцы для ПЭМ были приготовлены с использованием методики негативного контрастирования. Поддерживающие медные сетки для электронной микроскопии, покрытые пленкой аморфного углерода (01843-F; Ted Pella, США), обрабатывали в тлеющем разряде с помощью установки PELCOeasiGlow™ (Ted Pella). Исходный образец разводили в 0.1 М Tris-HCl буфере (рН 6.8) в 10 раз, наносили на сетки, проводили контрастирование 1%-ным раствором ацетата уранила в течение 1 мин и выдерживали сетки до полного высыхания. Изображения образцов получали на просвечивающем электронном микроскопе Titan S/TEM (Thermo Fisher Scientific) с CCD-детектором UltraScan 1000XP (Gatan, США) при ускоряющем напряжении 300 кВ (увеличение от 8000× до 20 000×).

Ферментация в трехлитровом ферментере

Ферментацию штамма *K. phaffii* Y-4287/pPIC-CP2 проводили в лабораторном ферментере КФ-103/4 (“Проинтех”, Россия) в соответствии с “Руководством по процессу ферментации *Pichia pastoris*” фирмы Invitrogen (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pichiaferm_prot.pdf).

Определение концентрации белка

Концентрацию белка измеряли по оптической плотности при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и экспрессия гена, кодирующего белок CP бактериофага MS2

Методом ПЦР с использованием кДНК бактериофага MS2 в качестве матрицы был амплифицирован фрагмент ДНК размером 393 п.н., представляющий собой ген, кодирующий белок CP, состоящий из 130 аминокислотных остатков.

Анализ аминокислотной последовательности с использованием программы NetNGlyc 1.0 показал наличие сайта гликозилирования NFG4–7 на N-конце белка CP. Посттрансляционная модификация белка такого типа в дрожжевых клетках может негативно сказаться на возможности самосборки ВПЧ, поэтому сайт гликозилирования был удален методом сайтспецифического мутагенеза. В результате триплет, кодирующий аминокислоту аспарагин, был заменен на триплет, кодирующий глутамин (N4Q).

Модифицированный таким образом ген, кодирующий CP бактериофага MS2, был клонирован в состав плазмидного вектора для экспрессии

в метилотрофных дрожжах *K. phaffii*. Полученная плазида pPIC-CP содержала экспрессионную кассету следующего состава: модифицированная последовательность гена под контролем мощного индуцируемого промотора PAOX1; терминатор транскрипции TTAOX1 *P. pastoris*; сигнальная последовательность α -фактора *Saccharomyces cerevisiae*; селективный маркер *BleoR*, кодирующий ген устойчивости к зеоцину под контролем дрожжевого TEF-промотора. Использование сконструированной плазмиды позволяет добиваться высокой концентрации целевого продукта в культуральной жидкости за счет интенсивного синтеза белка CP после накопления дрожжевой биомассы при использовании метанола в качестве индуктора.

Для наработки белка CP бактериофага MS2 в клетках метилотрофных дрожжей использован штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287, обладающий высоким экспрессионным потенциалом [22]. Плазида pPIC-CP была линейаризована и трансформирована в клетки дрожжевого штамма методом электропорации (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf). Селекцию трансформантов проводили на агаризованной среде YPD с добавлением антибиотика зеоцина. Присутствие в составе хромосом полученных трансформантов вставки экспрессионной кассеты подтверждено методом ПЦР с использованием праймеров, специфических для последовательности целевого гена.

Была проведена селекция трансформантов, направленная на отбор штаммов с наибольшим содержанием целевого белка в культуральной жидкости. В результате для дальнейших исследований был отобран штамм *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2.

Далее проводили ферментацию штамма *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2.

Очистка и характеристика ВПЧ

Белки, содержащиеся в супернатанте культуральной жидкости, очищали и концентрировали методом ПЭГ-преципитации, который позволяет осаждать высокомолекулярные ВПЧ, при этом низкомолекулярные примеси остаются в растворе [23]. ПЭГ-преципитация обычно применяется для очистки и концентрирования бактериофагов [20]. Кроме того, использование данного подхода предпочтительнее, чем осаждения белков сульфатом аммония, так как позволяет избежать последующей стадии диализа.

Анализ белков проводили методом нативного электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Этот вариант электрофоретического анализа позволяет фракционировать белки с очень высокой молекулярной массой: от 1000 до 5000 кДа, – в то время как прогнозируемая молекулярная масса капсида MS2 составляет около 2500 кДа. В качестве кон-

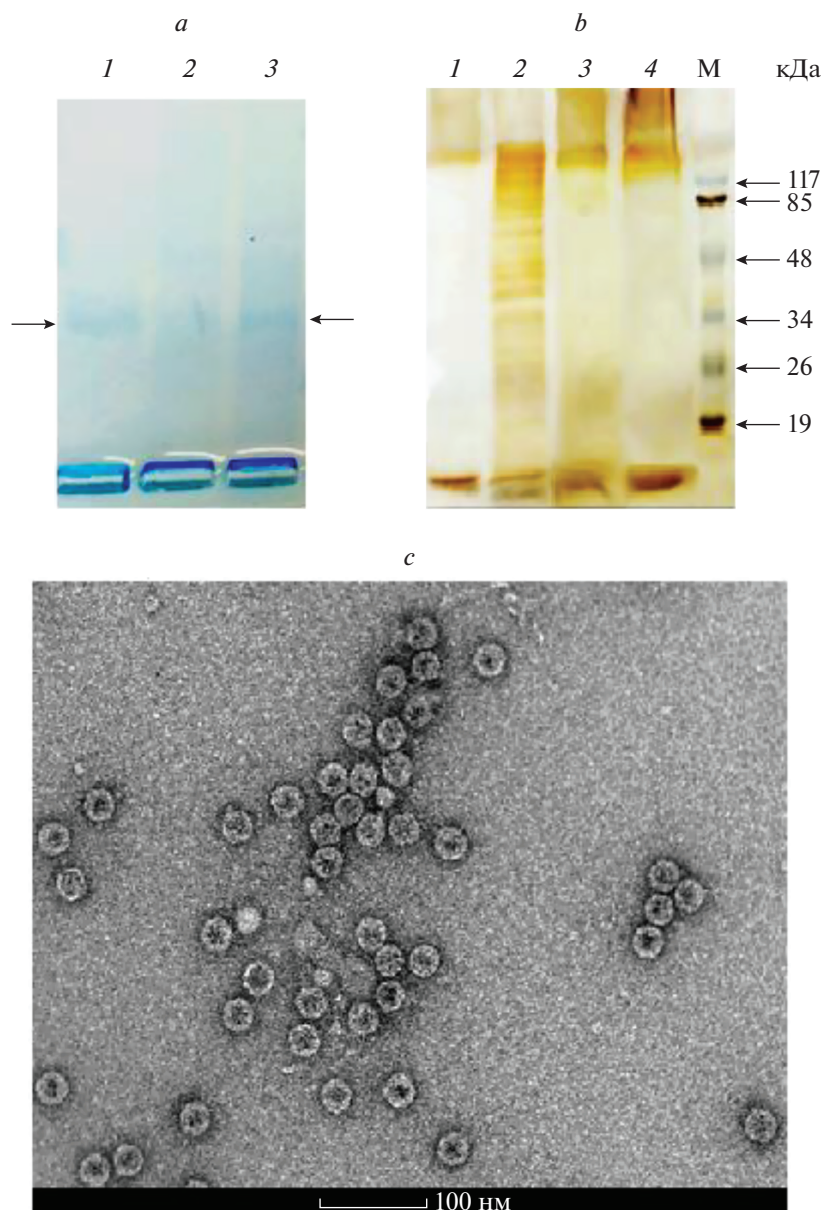


Рис. 1. Анализ белков супернатанта культуральной жидкости штамма *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2. *a* – Анализ белков в 1%-ном агарозном геле: 1 – бактериофаг MS2; 2 – супернатант культуральной жидкости; 3 – супернатант культуральной жидкости после ПЭГ-преципитации. Стрелками указано положение белков бактериофага MS2 и ВПЧ. *b* – Анализ белков электрофорезом в SDS-ПААГ: 1 – бактериофаг MS2; 2 – супернатант культуральной жидкости; 3 – супернатант культуральной жидкости после ПЭГ-преципитации; 4 – супернатант культуральной жидкости после ПЭГ-преципитации, гель-фильтрации и ультрафильтрации; М – маркер молекулярной массы белков (Thermo Fisher Scientific). *c* – Электронная микрофотография ВПЧ: масштабная линейка указывает размер 100 нм.

Fig. 1. Protein analysis of the culture medium supernatant of the *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2 strain. *a* – Analysis of proteins in 1% agarose gel: 1 – bacteriophage MS2; 2 – culture medium supernatant; 3 – culture medium supernatant after PEG precipitation. The arrows indicate the position of bacteriophage MS2 and VLP proteins. *b* – SDS-PAGE analysis: 1 – bacteriophage MS2; 2 – culture medium supernatant; 3 – culture medium supernatant after PEG precipitation; 4 – culture medium supernatant after PEG precipitation, gel filtration, and ultrafiltration; M – standard protein molecular weight (Thermo Fisher Scientific). *c* – Transmission electron micrograph of virus-like particles: scale bar indicates size 100 nm.

троля использовали фаголизат нативного бактериофага MS2, также предварительно сконцентрированного и очищенного методом ПЭГ-преципитации. Результаты исследований приведены на рис. 1*a*.

После ПЭГ-преципитации в образце культуральной жидкости визуализировали структуры белковой природы, сопоставимые по размеру и электрофоретической подвижности с нативным бактериофагом MS2.

Дальнейшую очистку предполагаемых ВПЧ проводили методом гель-фильтрации на колонке Sepharose CL-4B. Объем элюции фракции ВПЧ был определен по объему выхода нативного бактериофага MS2, взятого в качестве контроля. Концентрирование белков отобранной фракции проводили методом ультрафильтрации.

На всех стадиях выделения и очистки белки исследовали электрофорезом в SDS-PAAG. В качестве контроля использовали нативный бактериофаг MS2. Результаты исследований приведены на рис. 1b. Показано, что частицы бактериофага MS2 представлены двумя белковыми фракциями: белком размером ~14 кДа (что примерно соответствует теоретически рассчитанной массе белка CP – 13.9 кДа), а также высокомолекулярными белками, расположенными на границе концентрирующего и разделяющего гелей (рис. 1b, трек 1), что свидетельствует о том, что в данных условиях происходит лишь частичная денатурация фаговых капсидов. Белки таких же размеров детектировали и в образцах культуральной жидкости штамма *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2 (рис. 1b, треки 1–4).

Показано также, что преципитация ПЭГ позволяет очистить образцы предполагаемых ВПЧ от примеси большинства низкомолекулярных белков (рис. 1b, треки 2, 3), что совместно с гель-фильтрацией и ультрафильтрацией обеспечивает более чем 90%-ную очистку целевых белковых структур в сравнении с неочищенными образцами. Это подтверждено денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageJ 1.50b (рис. 1b, треки 2, 4).

По размеру и подвижности в электрическом поле полученные очищенные белковые структуры практически идентичны нативному бактериофагу MS2, что дает основание предположить наличие ВПЧ в культуральной жидкости.

Очищенные образцы исследованы методом ПЭМ. Продемонстрировано, что образец содержит сферические частицы диаметром 26–28 нм, что хорошо согласуется с характерным диаметром нативного бактериофага MS2 (рис. 1c). Проведенные исследования позволяют утверждать, что в культуральной жидкости дрожжей происходит успешная самосборка ВПЧ, по форме и размеру схожих с частицами нативного бактериофага MS2. Полученные таким образом ВПЧ могут быть легко очищены из культуральной жидкости методом преципитации ПЭГ с последующей гель-фильтрацией.

Оценка биотехнологического потенциала штамма *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2

Для предварительной оценки потенциала штамма *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2 было проведено его культивирование в трехлитровом лабораторном ферментере.

В процессе ферментации отбирали пробы культуральной жидкости, отделяли от клеток центрифугированием и измеряли концентрацию общего белка (рис. 2a, 1). Далее белки из 1 мл супернатанта культуральной жидкости отобранных проб очищали методом ПЭГ-преципитации, растворяли в 1 мл буфера, измеряли их концентрацию (рис 2a, 2) и анализировали электрофорезом в SDS-PAAG (рис. 2b).

Показано, что концентрация общего белка растет на протяжении всего времени ферментации и достигает значения 16 мг/мл (16 г/л). Концентрация высокомолекулярных белков, отделяемых преципитацией ПЭГ, в процессе ферментации растет и достигает максимального значения 5.3 мг/мл (5.3 г/л) к 150 ч культивирования, после чего незначительно снижается. Электрофоретический анализ показал, что высокомолекулярная белковая фракция, осажденная ПЭГ, состоит из белков молекулярной массой ~14 кДа (рис. 2b), то есть с большой вероятностью представляет собой ВПЧ бактериофага MS2, которые образуются в процессе самосборки из белка CP, секретируемого в культуральную жидкость в процессе ферментации штамма *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2.

Выход частично очищенных ВПЧ, полученных таким образом, достигал 5 г/л, тогда как при внутриклеточном формировании ВПЧ в дрожжевых клетках выход конечного продукта не превышает 10 мг/л [24]. Однако заметим, что выход целевого продукта составлял примерно 30% от общего белка в культуральной жидкости. Мы предполагаем, что большая часть низкомолекулярных белков культуральной жидкости представляет собой белок CP, не собранный в надмолекулярные структуры.

Самосборка – это спонтанное и специфическое взаимодействие субъединиц в упорядоченные формы [25]. Известно, что на сложный процесс формирования ВПЧ, их стабильность и агрегацию влияют различные физико-химические факторы [26, 27], такие как pH, солевой состав и ионная сила растворов. Ранее показано, что подбор солевого состава и pH раствора может существенно повлиять как на самосборку ВПЧ, так и на их стабильность [28]. Мы предполагаем, что оптимизация состава и pH ферментационной среды, а также условий культивирования может повлиять на процесс самосборки ВПЧ и привести к увеличению выхода целевого продукта.

ВПЧ бактериофага MS2 имеют большой потенциал для их использования в качестве платформ для создания эпитопных вакцин, а также средств направленной доставки генов и лекарственных средств [6, 29, 30]. Заметим, что возможность получения ВПЧ при экспрессии гена белка CP бактериофага MS2 в бактериальных и дрожжевых системах описана достаточно подроб-

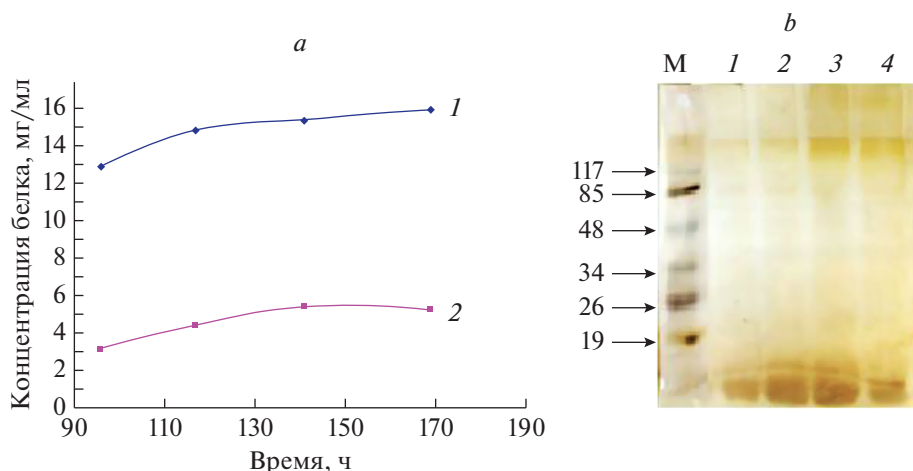


Рис. 2. Исследование белкового состава супернатанта культуральной жидкости штамма *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2 при ферментации в трехлитровом ферментере. *a* – Динамика накопления белка: 1 – общего, 2 – после преципитации ПЭГ. *b* – Анализ белков электрофорезом в SDS-ПААГ: М – маркер молекулярной массы белков; 1–4 – накопление белков в супернатанте культуральной жидкости через 96, 117, 141, 169 ч культивирования.

Fig. 2. Investigation of the proteins of the culture medium supernatant of the *K. phaffii* 4287/pPIC-CP2 strain during fermentation in a 3-liter fermenter. *a* – Dynamics of protein accumulation: 1, total protein; 2, protein after PEG precipitation. *b* – SDS-PAGE analysis: M, standard protein molecular weight; 1–4, accumulation of proteins in the culture medium supernatant for 96, 117, 141, 169 h of cultivation.

но [24, 26, 31], хотя во всех известных работах исследована внутриклеточная самосборка ВПЧ.

Мы предлагаем использование способа получения ВПЧ MS2 в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *P. pastoris* (*K. phaffii*), при котором рекомбинантный капсидный белок фага секретируется в культуральную жидкость, где и происходит самосборка ВПЧ.

Предлагаемый нами подход позволяет использовать все преимущества экспрессионной системы метилотрофных дрожжей *P. pastoris* (*K. phaffii*), а именно: высокоуровневую экспрессию гена, получение культуры высокой плотности и высоких концентраций целевого белка в культуральной жидкости, возможности масштабирования процесса ферментации и т.д., – что позволяет существенно увеличить выход целевого продукта и довести его до нескольких граммов в литре.

ВПЧ можно легко выделить и очистить, так как их самосборка происходит в культуральной жидкости, в связи с чем отпадает необходимость в разрушении клеток и последующей многостадийной очистке от клеточных компонентов. Кроме того, использование методов преципитации ПЭГ и гель-фильтрации для очистки ВПЧ не требует ни дорогостоящего оборудования, которое необходимо при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы или цезия, ни времязатратного диализа [26], но при этом позволяет получить конечный продукт высокой степени чистоты.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки технологии масштабного

производства рекомбинантных вакцин на платформе вирусоподобных частиц бактериофага MS2.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: грант для Курчатовского центра геномных исследований (Соглашение № 075-15-2019-1659); грант по биоресурсным коллекциям (Соглашение № 075-15-2021-1053).

Работа поддержана грантом НИЦ “Курчатовский институт” (Приказ № 2180 от 18.08.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roldão A., Mellado M.C.M., Castilho L.R., Carrondo M.J.T., Alvas P.M. Virus-like particles in vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines*, 2010, 9(10), 1149–1176. <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>
2. Jain N.K., Sahni N., Kumru O.S., Joshi S.B., Volkin D.B., Middaugh C.R. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. *Adv. Drug Del. Rev.*, 2015, 93, 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.023>
3. Jennings G.T., Bachmann M.F. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.*, 2008, 389(5), 521–536. <https://doi.org/10.1515/bc.2008.064>
4. Chackerian B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines*, 2007,

- 6(3), 381–390.
<https://doi.org/10.1586/14760584.6.3.381>
5. Lua L.H., Connors N.K., Sainsbury F., Chuan Y.P., Wibowo N., Middelberg A.P. Bioengineering virus like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.*, 2014, 111(3), 425–440.
<https://doi.org/10.1002/bit.25159>
 6. Ashley C.E., Carnes E.C., Phillips G.K., Durfee P.N., Bu-ley M.D., Lino C.A., Padilla D.P., Phillips B., Carter M.B., Willman C.L., Brinker C.J., Caldeira J.C., Chackerian B., Wharton W., Peabody D.S. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*, 2011, 5(7), 5729–5745.
<https://doi.org/10.1021/nn201397z>
 7. Zochowska M., Paca A., Schoehn G., Andrieu J.P., Chroboczek J. Adenovirus dodecahedron, as a drug delivery vector. *PLoS One*, 2009, 4(5), e5569.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005569>
 8. Nicastro J., Sheldon K., Slavev R.A. Bacteriophage lambda display systems: developments and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 2853–2866.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5521-1>
 9. Henry K.A., Arbabi-Ghahroudi M., Scott J.K. Beyond phage display: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. *Front. Microbiol.*, 2015, 6, 755.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00755>
 10. Beghetto E., Gargano N. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery. *Molecules*, 2011, 16, 3089–3105.
<https://doi.org/10.3390/molecules16043089>
 11. Jafari N., Abediankenari S. Phage particles as vaccine delivery vehicles: concepts, applications and prospects. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2015, 16(18), 8019–8029
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.18.8019>
 12. Tao P., Zhu J., Mahalingam M., Batra H., Rao V.B. Bacteriophage T4 nanoparticles for vaccine delivery against infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, 145, 57–72.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.025>
 13. Fu Y., Li J. A novel delivery platform based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *Virus Res.*, 2016, 211, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.022>
 14. Brown W.L., Mastico R.A., Wu M., Heal K.G., Adams C.J., Murrey J.B., Simpson J.C., Lord J.M., Robinson A.W.T., Stockley P.G. RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. *Intervirology*, 2002, 45(4–6), 371–380.
<https://doi.org/10.1159/000067930>
 15. Peabody D.S. Translational repression by bacteriophage MS2 coat protein expressed from a plasmid. A system for genetic analysis of a protein-RNA interaction. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 5684–5689.
 16. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.*, 2014, 5, 172.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
 17. Kushnir N., Streatfield S., Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 2012, 31, 58–83.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
 18. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol. Biotechnol.*, 2013, 53, 92–107.
<https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>
 19. Freivalds J., Dislers A., Ose V., Skrastina D., Cielens I., Pumpens P., Sasnauskas K., Kazaks A. Assembly of bacteriophage Q β virus-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, 2006, 123(3), 297–303.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.013>
 20. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984, 480 с.
 21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1659 p.
 22. Гордеева Т.Л., Борщевская Л.Н., Федай Т.В., Ткаченко А.А., Синеокий С.П. Изучение экспрессионного потенциала новых штаммов дрожжей рода *Komagataella*. *Биотехнология*, 2021, 37(4), 5–13.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-4-5-13>
 23. Lewis G.D., Metcalf T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54, 1983–1988.
<https://doi.org/10.1128/aem.54.8.1983-1988.1988>
 24. Legendre D., Fastrez J. Production in *Saccharomyces cerevisiae* of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs. *J. Biotechnol.*, 2005, 117, 183–194.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.01.010>
 25. Lehn J.M. Toward complex matter: supramolecular chemistry and self-organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(8), 4763–4768.
<https://doi.org/10.1073/pnas.072065599>
 26. Dika C., Duval J.F.L., Ly-Chatain H.M., Merlin C., Gantzer C. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 4939–4948.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00407-11>
 27. Wang S., Liu Y., Li D., Zhou T., Gao S., Zha E., Yue X. Preparation and evaluation of MS2 bacteriophage-like particles packaging hepatitis E virus RNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2016, 363(20), fnw221.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw221>
 28. Hashemi K., Ghahramani S.M., Ahmadian M.R., Malaekeh-Nikouei B., Bassami M.R., Dehghani H., Afkhami-Goli A. Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus like particles. *Sci. Rep.*, 2021, 11(1), 19851.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98706-1>
 29. Li J., Sun Y., Jia T., Zhang R., Zhang K., Wang L. Messenger RNA vaccine based on recombinant MS2 virus-like particles against prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 2014, 134, 1683–1694.
<https://doi.org/10.1002/ijc.28482>
 30. Wang G., Jia T., Xu X., Chang L., Zhang R., Fu Y., Li Y., Yang X., Zhand K., Lin G., Han Y., Li J. Novel miR-122 delivery system based on MS2 virus like particle surface displaying cell-penetrating peptide TAT for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2016, 7(37), 59402–59416.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10681>
 31. Rodríguez-Limas W.A., Sekar K., Tjo K.E. Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2013, 24, 1089–1093.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.008>

Biotechnological Potential of Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) for Assembly of Bacteriophage MS2 Virus-Like Particles

L. N. Borschevskaya^{a, #}, T. L. Gordeeva^a, E. B. Pichkur^a, V. R. Samygina^{a, b}, and S. P. Sineoky^a

^a*Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123182 Russia*

^b*A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Crystallography and Photonics
Federal Scientific Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia*

[#]*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru*

Abstract—Successful assembly of bacteriophage MS2 virus-like particles (VLPs) from a secreted recombinant capsid protein in the culture medium of the *Komagataella phaffii* methylophilic yeast has been shown. The yield of VLPs was 5 g/L and reached 30% of the total protein of the culture liquid supernatant. The VLPs were well-ordered icosahedral structures with a diameter of 26–28 nm, which was confirmed by transmission electron microscopy. A simple method for the isolation and purification of the VLPs was proposed, which ensures the purity of the target protein structures of more than 90%. The results obtained can be used for development of a technology for the large-scale production of recombinant vaccines based on bacteriophage MS2 VLPs.

Keywords: virus-like particle, self-assembly, bacteriophage MS2, capsid protein, yeast expression system, *Komagataella phaffii*, *Pichia pastoris*