

БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ БИОЛОГИЯ BIOLOGY AND MEDICAL BIOLOGY

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОНСТИТУТИВНОЙ И ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА L1 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 18 ТИПА В *KLUYVEROMYCES LACTIS*

**Рар А.А.,
Волосникова Е.А.,
Беленькая С.В.,
Гогина Я.С.,
Щербаков Д.Н.**

ФБУН «Государственный научный
центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора (630559,
р.п. Кольцово, Новосибирская область,
Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Рар Анастасия Анатольевна
e-mail: rar_aa@vector.nsc.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Использование профилактических вакцин против ВПЧ показало эффективность в снижении заболеваемости раком шейки матки. Дрожжи *Kluyveromyces lactis* являются перспективной платформой для получения рекомбинантных вакцинных антигенов благодаря статусу GRAS, наличию эукариотической системы посттрансляционных модификаций и низкой стоимости питательных сред.

Цель исследования. Разработка штамма-продуцента на основе *Kluyveromyces lactis* для получения рекомбинантного белка L1 вируса папилломы человека 18 типа.

Материалы и методы. Для экспрессии гена L1 ВПЧ 18 типа сконструированы два интеграционных вектора. Первый – pOG-HPV18 с конститутивным промотором GAP, второй – pKB-HPV18 с индуцибельным промотором LAC4. Полученными векторами трансформировали клетки *K. lactis* методом электропорации. Культивирование рекомбинантных штаммов проводили на среде YEPm. Индукцию синтеза белка для штамма *K. lactis* / pKB-HPV18 проводили с помощью лактозы. Целевой белок из клеточных лизатов выделяли методом ионообменной хроматографии (SP Sepharose). Идентификацию белка проводили с помощью хромато-масс-спектрометрии. Эксперименты выполнены в трех биологических повторностях. Статистическую значимость различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты. Получены штаммы-продуценты для обеих конструкций. Выход биомассы для *K. lactis* / pOG-HPV18 составил 20 г/л, для *K. lactis* / pKB-HPV18 – 34 г/л. Степень чистоты целевого белка после одной стадии очистки достигла 70–80 % для конститутивной системы и приблизилась к 90 % для индуцибельной системы. Методом хромато-масс-спектрометрии подтверждена идентичность и структурная целостность полученного белка.

Заключение. Сконструированы два штамма-продуцента *K. lactis*, обеспечивающие синтез белка L1 ВПЧ 18 типа. Система с индуцибельным промотором LAC4 показала более высокий выход биомассы и степень чистоты целевого белка по сравнению с конститутивной системой. Полученные результаты создают основу для дальнейшей разработки доступной системы продукции вакцинного антигена ВПЧ 18 типа.

Ключевые слова: *Kluyveromyces lactis*, вирус папилломы человека, ВПЧ 18 типа, рекомбинантный белок L1, экспрессия, индуцибельный промотор, вирусоподобные частицы

Статья поступила: 31.03.2026
Статья принята: 10.09.2026
Статья опубликована: 09.10.2026

Для цитирования: Рар А.А., Волосникова Е.А., Беленькая С.В., Гогина Я.С., Щербаков Д.Н. Сравнительная характеристика конститутивной и индуцибельной систем экспрессии белка L1 вируса папилломы человека 18 типа в *Kluyveromyces lactis*. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 62-70. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.7

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF CONSTITUTIVE AND INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEMS FOR HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 L1 PROTEIN IN *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Rar A.A.,
Volosnikova E.A.,
Belenkaya S.V.,
Gogina Ya.S.,
Shcherbakov D.N.

State Research Center of Virology and
Biotechnology «Vector», Federal Service
for Surveillance on Consumer Rights
Protection and Human Well-being
(Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559,
Russian Federation)

Corresponding author:
Anastasiya A. Rar
e-mail: rar_aa@vector.nsc.ru

ABSTRACT

Background. The use of prophylactic HPV vaccines has demonstrated effectiveness in reducing the incidence of cervical cancer. The yeast *Kluyveromyces lactis* is a promising platform to produce recombinant vaccine antigens, owing to its GRAS status, eukaryotic post translational modification capabilities, and the low cost nutrient media.

Aim. To develop a producer strain based on *Kluyveromyces lactis* for the production of recombinant human papillomavirus type 18 L1 protein.

Materials and Methods. For the expression of the HPV18 L1 gene, two integrative vectors were constructed. The first, pKB-HPV18, with a constitutive GAP promoter, and the second, pKB-HPV18, with an inducible LAC4 promoter. *K. lactis* cells were transformed with the obtained vectors by electroporation. Recombinant strains were cultivated in YEPm medium. Protein synthesis induction for the *K. lactis*/pKB-HPV18 strain was performed using lactose. The target protein was isolated from cell lysates by ion exchange chromatography (SP SepLife). Protein identification was carried out using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC MS/MS). All experiments were performed in three biological replicates. Statistical significance was assessed using Student's t-test ($p < 0.05$).

Results. Producer strains were obtained for both constructs. The biomass yield was 20 g/L for *K. lactis*/pKB-HPV18 and 34 g/L for *K. lactis*/pKB-HPV18. The purity of the target protein after a single ion-exchange chromatography step reached 70–80% for the constitutive system and approached 90% for the inducible system. The identity and structural integrity of the obtained protein were confirmed using LC MS/MS.

Conclusion. Two *K. lactis* producer strains capable of synthesizing HPV18 L1 protein were successfully constructed. The system with the inducible LAC4 promoter showed higher biomass yield and target protein purity compared to the constitutive system. These results provide a foundation for the further development of an affordable production system for the HPV18 vaccine antigen.

Keywords: *Kluyveromyces lactis*, human papillomavirus, HPV type 18, recombinant L1 protein, expression, inducible promoter, virus-like particles

Received: 31.03.2026
Accepted: 10.09.2026
Published: 09.10.2026

For citation: Rar A.A., Volosnikova E.A., Belenkaya S.V., Gogina Ya.S., Shcherbakov D.N. Comparative characterization of constitutive and inducible expression systems for human papillomavirus type 18 L1 protein in *Kluyveromyces lactis*. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 62-70. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.7

ВВЕДЕНИЕ

Рак шейки матки (РШМ) остается одной из ведущих причин заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований среди женщин во всем мире. Ежегодно регистрируется более 660 000 новых случаев и 348 000 летальных исходов, при этом среди женщин репродуктивного возраста РШМ занимает второе место в структуре смертности от онкологических заболеваний [1, 2]. Основным этиологическим фактором развития заболевания является персистирующая инфекция, вызванная вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска. ДНК ВПЧ обнаруживается в 99,8 % случаев РШМ, при этом на долю типов 16 и 18 приходится 71 % всех случаев [1–4]. Структура циркулирующих генотипов существенно варьируется в зависимости от региона, что определяет необходимость региональной адаптации вакцинных препаратов [5].

РШМ является единственным злокачественным новообразованием, которое может быть элиминировано с помощью профилактических мер. В 2020 году Всемирной организацией здравоохранения принята Глобальная стратегия ускоренной ликвидации рака шейки матки, ключевым элементом которой является массовая вакцинация [1, 2]. Для осуществления данной стратегии необходима разработка доступных и эффективных вакцинных препаратов, способных обеспечить охват населения в странах с различным уровнем жизни.

В основе современных вакцин против ВПЧ лежат рекомбинантные субъединичные препараты, представляющие собой вирусоподобные частицы (VLP), сформированные из основного капсидного белка L1. В качестве продуцентов зарегистрированных вакцин против ВПЧ в настоящее время используются бактерии (*Escherichia coli*), дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Komagataella phaffii* (ранее *Pichia pastoris*) и клетки насекомых (бакуловирусная система экспрессии) [6–8]. В данном случае, преимущества и недостатки каждой из систем экспрессии выражаются в стоимости культивирования, корректности посттрансляционных модификаций, обеспечивающих валидную сборку иммуногенных VLP, и выходе целевого белка.

Дрожжи представляют собой безопасную, за счёт статуса GRAS (Generally Recognized as Safe), и привлекательную платформу для получения рекомбинантных белков фармацевтического назначения, благодаря простоте культивирования, отсутствию эндотоксинов, а также наличию эукариотического аппарата посттрансляционных модификаций. В настоящее время в качестве дрожжевых продуцентов активно используется вид *Saccharomyces cerevisiae*, однако его применение может осложняться рядом факторов, таких как склонность к гипергликозилированию продуцируемых белков, а также аллергенность α -1,3-связанных остатков маннозы на концах N-углеводных цепей. Хорошей альтернативой *S. cerevisiae* может стать вид дрожжей *Kluyveromyces lactis*, который обладает аналогичными преимуществами, но при этом демонстрирует

отрицательный эффект Крэбтри и более аутентичное гликозилирование, что характеризует его как метаболически более эффективного продуцента [9, 10].

Природная способность *K. lactis* метаболизировать лактозу в качестве единственного источника углерода в среде обусловлена наличием генов лактозного оперона: *LAC4* – кодирует β -галактозидазу и *LAC12* – кодирует пермеазу лактозы. Это преимущество позволяет *K. lactis* использовать молочную сыворотку – основной отход молочной продукции с высоким содержанием лактозы (4–5 %), белков и витаминов, как питательную среду. Использование молочной сыворотки при культивировании *K. lactis* может в значительной степени снизить стоимость производства рекомбинантных белков, что играет ключевую роль в обеспечении доступности вакцин в странах со средним и низким индексом жизни, где проблема ВПЧ-ассоциированных заболеваний проявляется наиболее выражено [11, 12].

Кроме того, сам промотор *LAC4*, индуцируемый лактозой, может быть использован для управляемой экспрессии целевого гена, что создает дополнительную технологическую гибкость: в процессе культивирования на молочной сыворотке происходит как накопление биомассы, так и индукция синтеза рекомбинантного белка без необходимости внесения дополнительных дорогостоящих индукторов.

Таким образом, *K. lactis* представляет собой не только безопасную и технологичную платформу для экспрессии гетерологичных белков, но и позволяет интегрировать концепцию устойчивого производства за счёт использования возобновляемого и малозатратного сырья.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью настоящего исследования является разработка штамма-продуцента на основе *Kluyveromyces lactis* для получения рекомбинантного белка L1 вируса папилломы человека 18 типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование экспрессионных векторов

Для экспрессии гена *L1* ВПЧ 18 типа использовали два вектора: pPOG, содержащий конститутивный промотор GAP, и pKB, содержащий индуцибельный промотор *LAC4*. Ген *L1*, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в дрожжах, синтезировали на заказ (ООО «ДНК-синтез», Россия). Синтезированный ген и векторы pPOG и pKB обрабатывали рестриктазами HindIII и AspA2I (ООО «СибЭнзайм», Россия). Полученные продукты очищали и лигировали при помощи лигазы бактериофага T4 (ООО «СибЭнзайм», Россия). Продуктами лигазной реакции трансформировали *E. coli* штамм NEB stable. ДНК клонов выделяли с использованием набора Plasmid MiniPrep Kit (Qiagen, Германия). Для подтверждения корректности сборки

и отсутствия мутаций в кодон-оптимизированной последовательности гена *L1* проводили секвенирование по Сенгеру (ЦКП «Геномика», Россия). Анализ секвенограмм подтвердил 100 % идентичность нуклеотидной последовательности.

Трансформация *Kluyveromyces lactis*

Клетки *K. lactis* (штамм SVB-1) выращивали в среде YEPD (1 % дрожжевой экстракт, 2 % пептон, 2 % глюкоза) до середины логарифмической фазы ($OD_{600} \sim 1,0-1,5$), осаждали центрифугированием (1500 g, 5 мин, 4°C), дважды промывали ледяной стерильной водой и однократно — 1 М сорбитолом. К 40 мкл клеток добавляли 1–2 мкг плазмидной ДНК (pPOG-HPV18 или pKB-HPV18). Электропорацию проводили в кюветах с зазором 2 мм при напряжении 1,5 кВ, емкости 25 мкФ и сопротивлении 200 Ом (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad, США). После импульса клетки ресуспендировали в 1 мл 1 М сорбитола, инкубировали 1 ч при 30°C и высевали на селективную агаризованную среду YEPm с зеотином (1 мг/мл).

Условия культивирования

Для инокулята единичные колонии трансформантов переносили в пробирки с 5 мл среды YEPm (дрожжевой экстракт — 10 г/л, пептон — 20 г/л, глюкоза — 20 г/л, KH_2PO_4 — 1 г/л) после стерилизации добавляли глюкозу до 2 %, пантотенат кальция до 1,6 мкг/мл и зеотин до 0,1 мг/мл. Культивирование проводили при 30°C, 220 об/мин в течение 24 ч.

Для наработки белка использовали среду аналогичного состава с конечной концентрацией глюкозы 3 %. Инокулят вносили в количестве 1 % в конические колбы (250 мл среды в колбах объемом 1 л) и культивировали при 30°C, 230 об/мин в течение 144 ч. Для индукции экспрессии в системе с промотором LAC4 через 48 ч вносили [галактозу/лактозу] до конечной концентрации 3 %.

Получение клеточного лизата

Клетки осаждали центрифугированием (10 000 g, 20 мин, 4°C). Осадок (20 г влажных клеток) ресуспендировали в 200 мл ледяного буфера (20 мМ фосфат натрия, 1 мМ PMSF, 1,7 мМ ЭДТА, 20 мМ NaCl, pH 7,0) и инкубировали 10 мин при 2–8°C. Разрушение проводили в гомогенизаторе высокого давления YC-NANO10 (Yocell Biotechnology, Китай) при 900–1000 бар, четыре цикла при показателе пульсации – 15, с охлаждением системы до 10°C. Степень разрушения контролировали по оптической плотности и микроскопически. Лизат центрифугировали (10 000 g, 30 мин, 4°C), супернатант (250 мл) отбирали для очистки.

Ионообменная хроматография

Очистку проводили на хроматографе ÄKTA pure 150M (GE HealthCare, США) с использованием колонки SP Sepharose (объем 20 мл), уравновешенной буфером (50 мМ фосфат натрия, 20 мМ NaCl, pH 6,2). Супернатант (250 мл) наносили на колонку, элюцию проводили 15-кратным градиентом увеличения концентрации NaCl с 20 мМ до 1 М в буфере (50 мМ фосфат натрия, pH 6,2). Фракции собирали с момента достижения показателя поглощения элюата 50 mAU при длине волны 280 нм. Целевые фракции объединяли и концентрировали

на центрифужных концентраторах с порогом отсеивания 10 кДа (Amicon Ultra, Merck Millipore, Ирландия).

Хромато-масс-спектрометрия

Белок растворяли в 300 мкл буфера для денатурации (7 М мочевины, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0), инкубировали 30 мин при 95°C, добавляли DTT до 4 мМ и инкубировали еще 30 мин при 95°C. После охлаждения добавляли йодацетамид до 15 мМ и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Образец разбавляли 1200 мкл 50 мМ трис-HCl (pH 8,0). К 700 мкл раствора добавляли 10 мкг трипсина Sequencing Grade (Promega, США) и инкубировали 18 ч при 37°C.

Разделение продуктов гидролиза проводили на колонке C18 (2,1 × 150 мм, 2,7 мкм, AdvancedBio Peptide Plus, Agilent, США) в градиенте растворителей: А — вода с 0,1 % муравьиной кислоты, Б — ацетонитрил с 0,1 % муравьиной кислоты, скорость потока 0,2 мл/мин (градиент: 0 мин — 5 % Б, 44 мин — 40 % Б, 48 мин — 95 % Б). Детектирование проводили на квадруполь-время-пролетном масс-спектрометре LC/qTOF 6530 (Agilent, США) с ионизацией электроспреем в положительном режиме. Параметры: напряжение на капилляре 4000 В, температура газа 350°C, скорость потока газа 10 л/мин, диапазон сканирования MS^1 100–2000 m/z, MS^2 50–2000 m/z, энергия соударений 0,045 × (m/z).

Идентификацию белков проводили с использованием алгоритма Comet [13] по базе данных аминокислотных последовательностей L1 ВПЧ 18 типа.

Статистический анализ

Все эксперименты по культивированию и очистке целевого белка выполнены в трех независимых биологических повторностях ($n = 3$). Результаты представлены как среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента для несвязанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версия 8.0 (GraphPad Software, США) или Microsoft Excel (Microsoft Corp., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения рекомбинантного белка L1 вируса папилломы человека 18 типа были сконструированы две экспрессионные плазмидные конструкции на основе векторов pPOG и pKB.

Вектор pPOG содержит конститутивный промотор GAP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) *Kluyveromyces lactis*, обеспечивающий постоянный уровень транскрипции целевого гена, и селективный маркер зеотин, позволяющий проводить отбор трансформантов на среде, содержащей данный антибиотик. Ген *L1* ВПЧ 18 типа, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в дрожжах, был клонирован в составе вектора под контроль промотора GAP.

Полученная плазмидная конструкция pPOG-HPV18 представлена на рисунке 1А.

Вектор pKB содержит индуцибельный промотор LAC4 (β -galactosidase) *Kluyveromyces lactis*, активируемый в присутствии лактозы или галактозы, что позволяет разделить фазы накопления биомассы и индукции целевого белка. Ген L1 ВПЧ 18 типа был клонирован под контроль промотора LAC4, в результате чего получена конструкция pKB-HPV18 (рис. 2А). Корректность встраивания гена-мишени в обеих конструкциях подтверждена секвенированием. Анализ секвенограмм показал сохранение нуклеотидной последовательности: в целевом гене L1 ВПЧ 18 типа отсутствовали нуклеотидные замены, делеции или инсерции.

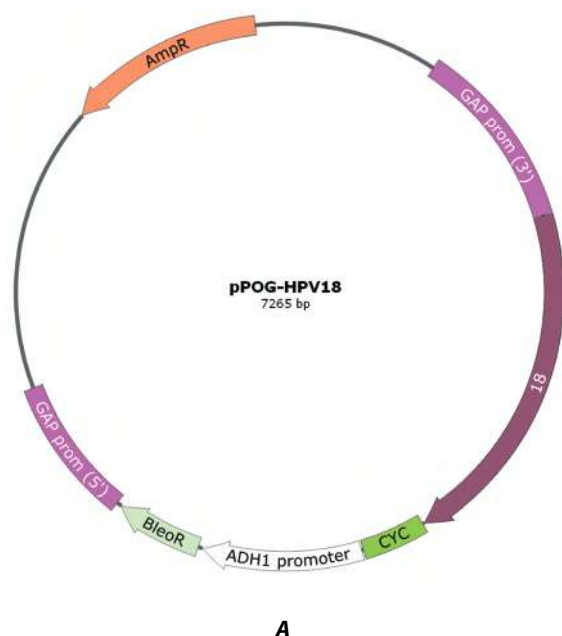
Полученными плазмидными конструкциями pPOG-HPV18 и pKB-HPV18 трансформировали клетки *K. lactis* методом электропорации. Трансформанты отбирали на селективной среде с добавлением зеоцина (1 мг/мл). После 3–5 суток инкубации при 30°C были получены единичные колонии трансформантов для каждой конструкции. Отбор клонов-продуцентов проводили на основе анализа экспрессии целевого белка методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях.

Для каждого типа промотора были оптимизированы условия культивирования, обеспечивающие максимальный выход целевого белка. Для продуцента на основе *K. lactis* / pPOG-HPV18 (конститутивный промотор)

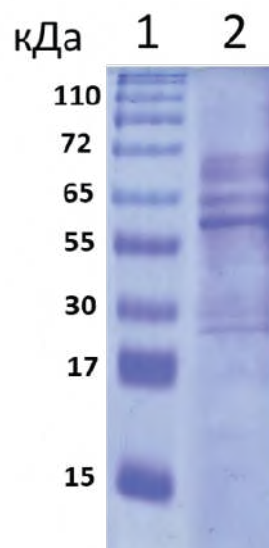
культивирование проводили в среде YEPm с начальной концентрацией глюкозы 3 % в течение 144 ч при 30°C. Постоянная экспрессия гена L1 под контролем промотора GAP обеспечила накопление целевого белка на протяжении всего периода культивирования без необходимости внесения дополнительных индукторов.

Для продуцента несущего плазмиду pKB-HPV18 (индуцибельный промотор) культивирование проводили в две стадии: накопление биомассы в течение 48 ч на среде YEPm с глюкозой, после чего вносили лактозу в качестве индуктора до конечной концентрации в среде 3 % и продолжали культивирование в течение следующих 96 ч при тех же условиях. Такая схема культивирования позволила минимизировать метаболическую нагрузку на клетки в фазе роста и обеспечила высокий уровень экспрессии после индукции.

По истечении времени культивирования биомассу отделяли центрифугированием. Выход влажной биомассы составил $20,1 \pm 1,5$ г/л для продуцента *K. lactis* / pPOG-HPV18 и $34,3 \pm 2,1$ г/л для *K. lactis* / pKB-HPV18 ($p < 0,05$). Дезинтеграцию клеток проводили с использованием гомогенизатора высокого давления за четыре цикла при показателе 900–1000 бар. Степень разрушения клеток оценивали по изменению оптической плотности и микроскопически, по истечении процесса она составила 98 %. Центрифугированием осаждали клеточные обломки, получая супернатант, содержащий фракцию растворимого целевого белка.



А



В

РИС. 1.

Продукция белка L1 ВПЧ 18 типа в системе с конститутивным промотором GAP. А — карта плазмидного вектора pPOG-HPV18, содержащего ген L1 под контролем промотора GAP. В — электрофореграмма белка L1, выделенного из биомассы продуцента *K. lactis* / pPOG-HPV18. Дорожки: 1 — маркер молекулярной массы, 2 — белок L1 после ионообменной хроматографии, основная полоса соответствует белку L1 (~55 кДа).

FIG. 1.

Production of HPV type 18 L1 protein in a system with a constitutive GAP promoter. (A) Map of the pPOG-HPV18 plasmid vector, containing the L1 gene under the control of the GAP promoter. (B) Electropherogram of the L1 protein isolated from the biomass of the producer strain *K. lactis*/pPOG-HPV18. Lanes: 1 – Molecular weight marker; 2 – L1 protein fraction after ion-exchange chromatography, the main band corresponds to the L1 protein (~55 kDa).

Выделение рекомбинантного белка L1 из полученных лизатов проводили методом ионообменной хроматографии на колонке SP Sephlife. Целевые фракции, соответствующие молекулярной массе олигомерных форм белка L1, объединяли и концентрировали. Чистоту и молекулярную массу полученного белка оценивали методом электрофореза в 10 % ПААГ.

На рисунке 1В представлены результаты электрофоретического анализа белка L1, выделенного из биомассы продуцента *K. lactis* / pPOG-HPV18. На рисунке 2В представлены аналогичные данные для продуцента *K. lactis* / pKB-HPV18. В обоих случаях наблюдается полоса, соответствующая молекулярной массе белка L1 (около 55–60 кДа), что подтверждает успешную продукцию целевого белка в обеих системах. В то же время проведение очистки при помощи одной стадии ионообменной хроматографии не позволило полностью очистить целевой белок. Степень чистоты целевого белка после одной стадии ионообменной хроматографии составила $75,4 \pm 3,2$ % для продуцента *K. lactis* / pPOG-HPV18 и $89,1 \pm 2,5$ % для *K. lactis* / pKB-HPV18 ($p < 0,05$).

Идентичность и структурная целостность полученного рекомбинантного белка L1 ВПЧ 18 типа были подтверждены методом хромато-масс-спектрометрии. По результатам обработки трипсином и последующего анализа на тандемном квадруполь-времетра-масс-спектрометре для обеих фракций были идентифицированы пептиды, соответствующие референсной последовательности L1 ВПЧ 18 типа. Для фракции

I идентифицировано 635 пептидов с максимальным SCORE 136, для фракции II — 685 пептидов с максимальным SCORE 200. Полученные данные подтверждают, что исследуемые образцы содержат целевой белок L1 ВПЧ 18 типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании была продемонстрирована возможность получения рекомбинантного белка L1 вируса папилломы человека 18 типа с использованием дрожжевой системы экспрессии на основе *Kluyveromyces lactis*. Выбор *K. lactis* в качестве продуцента обусловлен рядом преимуществ, включая статус GRAS, наличие эукариотического аппарата посттрансляционных модификаций и отсутствие эндотоксинов. Кроме того, способность *K. lactis* утилизировать лактозу, позволяет использовать дешевые питательные среды на основе молочной сыворотки. Важно отметить, что преимущества использования молочной сыворотки в системе с *K. lactis* не ограничиваются низкой стоимостью субстрата. Во-первых, данный подход позволяет реализовать «одностадийную» стратегию культивирования, поскольку лактоза выступает одновременно и источником углерода, и индуктором промотора LAC4, что исключает необходимость внесения дополнительных индукторов (например, галактозы или метанола) на поздних стадиях ферментации. Это

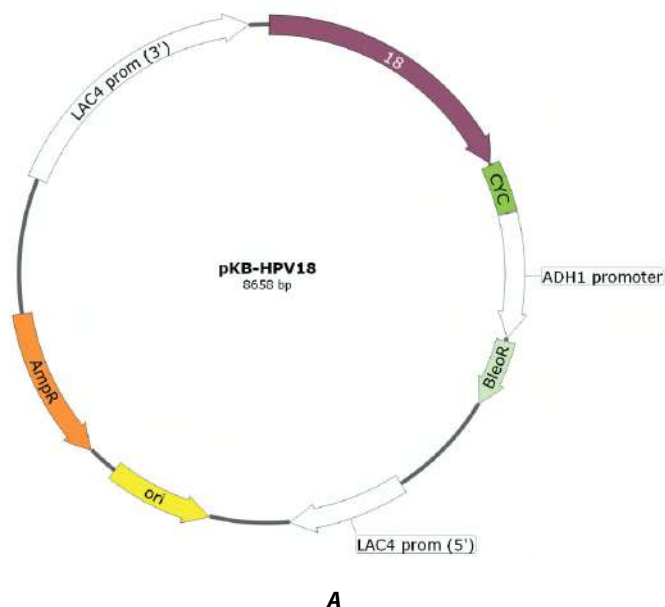


РИС. 2.

Продукция белка L1 ВПЧ 18 типа в системе с индуцибельным промотором LAC4. **А** — карта плазмидного вектора pKB-HPV18, содержащего ген L1 под контролем промотора LAC4. **В** — электрофореграмма белка L1, выделенного из биомассы продуцента *K. lactis* / pKB-HPV18. Дорожки: 1 — маркер молекулярной массы, 2 — белок L1 после ионообменной хроматографии, основная полоса соответствует белку L1 (~55 кДа).

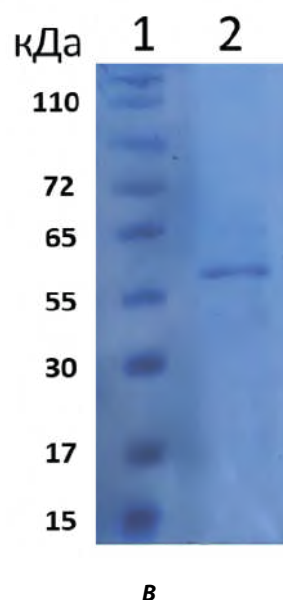


FIG. 2.

Production of HPV type 18 L1 protein in a system with an inducible LAC4 promoter. **(A)** Map of the pKB-HPV18 plasmid vector, containing the L1 gene under the control of the LAC4 promoter. **(B)** Electrophorogram of the L1 protein isolated from the biomass of the producer strain *K. lactis*/pKB-HPV18. Lanes: 1 – Molecular weight marker; 2 – L1 protein fraction after ion-exchange chromatography, the main band corresponds to the L1 protein (~55 kDa).

не только снижает себестоимость, но и упрощает технологический процесс, уменьшая риск контаминации. Во-вторых, молочная сыворотка содержит набор микроэлементов и витаминов, которые могут оказывать положительное влияние на физиологическое состояние клеток и снижать стресс, связанный с продукцией гетерологичного белка. В-третьих, использование отходов молочной промышленности решает экологическую проблему их утилизации, что является важным аспектом устойчивого развития биотехнологических производств [11, 12].

Что касается аллергенности рекомбинантного белка L1, полученного в *K. lactis*, то данный продуцент имеет преимущество перед *S. cerevisiae*. Клетки *S. cerevisiae* известны способностью к гипергликозилированию и содержат терминальные α -1,3-связанные остатки маннозы, которые являются сильными аллергенами и могут вызывать нежелательные иммунные реакции у человека [9, 10]. В отличие от них, *K. lactis* характеризуется более короткими и аутентичными N-связанными углеводными цепями, лишёнными α -1,3-маннозных эпитопов, что потенциально снижает риск аллергических реакций при вакцинации. Тем не менее, для окончательного заключения о безопасности и иммуногенности полученного препарата необходимы дополнительные исследования *in vitro* (тесты на клеточных культурах) и *in vivo* (экспериментальные животные модели), включая оценку специфического IgE-ответа.

В ходе работы было сконструировано два плазмидных интеграционных вектора, первый – pPOG-HPV18 с конститутивным промотором GAP, второй – pKB-HPV18 с индуцибельным промотором LAC4. Обе конструкции были успешно использованы для трансформации *K. lactis* и получения стабильных клонов-продуцентов.

Анализ накопления целевого белка выявил различия между двумя системами. Продуцент *K. lactis* / pPOG-HPV18 обеспечивал непрерывный синтез белка L1 на протяжении всего периода культивирования, что характерно для конститутивных промоторов. Однако выход биомассы для данной системы составил $20,1 \pm 1,5$ г/л, что статистически значимо ниже ($p < 0,05$) показателя для *K. lactis* / pKB-HPV18 ($34,3 \pm 2,1$ г/л). Вероятно, это связано с тем, что постоянная экспрессия гена гетерологичного белка создает метаболическую нагрузку на клетки, направляя ресурсы на синтез рекомбинантного белка в ущерб накоплению биомассы [14].

В системе с индуцибельным промотором LAC4 двухстадийная стратегия культивирования (накопление биомассы на глюкозе с последующей индукцией лактозой) позволила сначала достичь высокой плотности клеток, а затем инициировать синтез целевого белка. Более высокий выход биомассы ($34,3 \pm 2,1$ г/л) и более высокая степень чистоты после одной стадии ионообменной хроматографии ($89,1 \pm 2,5$ % против $75,4 \pm 3,2$ % для *K. lactis* / pPOG-HPV18, $p < 0,05$) свидетельствуют о преимуществах индуцибельной системы.

Более высокая чистота может объясняться тем, что индукция экспрессии на поздних стадиях

культивирования снижает накопление белков клеточного стресса и протеолитических ферментов, которые могут негативно влиять на процесс хроматографической очистки [15].

Очистка рекомбинантного белка L1 с использованием одной стадии ионообменной хроматографии на SP SepLife позволила получить белок с чистотой 70–90 % в зависимости от системы экспрессии. Сбор фракций при проведении ионообменной хроматографии производился по оптической плотности при $\lambda = 280$ нм. Анализ фракций производили методом электрофореза в 10 % ПААГ в редуцирующих условиях. Однако, для оценки потенциальной иммуногенности, обусловленной корректной сборкой вирусоподобных частиц, необходимы дополнительные методы анализа, позволяющие оценить структуру VLP, такие как электронная микроскопия и динамическое рассеяние света [16, 17].

Получение высокой степени чистоты образца (до 90 % для pKB-HPV18) при проведении одностадийной хроматографии представляет собой положительный результат, учитывая, что при промышленном производстве вакцин зачастую используется несколько этапов очистки [18]. Следующие этапы оптимизации процесса могут включать ионообменную или аффинную хроматографии для соответствия образца требованиям чистоты фармакопеи (> 95 %).

Методом хромато-масс-спектрометрии было подтверждено соответствие полученного образца искомой аминокислотной последовательности. Идентификация 635 пептидов для фракции I и 685 пептидов для фракции II при высоких значениях SCORE (136 и 200 соответственно) подтверждает, что исследуемые образцы соответствуют референсной последовательности рекомбинантного L1 ВПЧ 18 типа, а высокое покрытие последовательности (порядка 87 %) свидетельствует о структурной целостности белка и отсутствии у него значительных деградиационных изменений в процессе очистки.

Помимо подтверждения идентичности белка, метод хромато-масс-спектрометрии позволяет оценить посттрансляционные модификации, в том числе гликозилирование [19]. В случае основного капсидного белка ВПЧ, способного самоорганизовываться в VLP, характер гликозилирования может оказывать влияние на иммуногенность и стабильность VLP. Дальнейший анализ данных хромато-масс-спектрометрии на присутствие N-гликозилирования по консервативным сайтам (Asn-X-Ser/Thr) позволит оценить, насколько гликозилирование рекомбинантного L1, полученного в *K. lactis*, отличается от такового в других дрожжевых системах и соответствует ли оно нативному белку.

Одним из ключевых преимуществ *K. lactis*, которое было отмечено во введении, является его способность утилизировать лактозу. Хотя в настоящем исследовании культивирование производилось на стандартной среде YEPm с глюкозой, полученные результаты создают основу для перехода на более дешёвые питательные среды. Использование молочной сыворотки в качестве

основного источника углерода и энергии не только снижает себестоимость производства, но и решает экологическую проблему утилизации отходов молочной промышленности [20].

Особый интерес представляет синергия между использованием молочной сыворотки и промотором LAC4. Поскольку лактоза одновременно является и питательным субстратом, и индуктором экспрессии, можно разработать одностадийный процесс культивирования на молочной сыворотке, в котором накопление биомассы и индукция целевого белка происходят автоматически по мере потребления лактозы. Это существенно упрощает технологический процесс и снижает потребность в дорогостоящих индукторах, таких как галактоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе успешно сконструированы два штамма-продуцента *Kluyveromyces lactis*, экспрессирующие рекомбинантный белок L1 вируса папилломы человека 18 типа под контролем конститутивного промотора GAP и индуцибельного промотора LAC4. Показано, что система с индуцибельным промотором LAC4 обеспечивает статистически значимо более высокий выход биомассы ($34,3 \pm 2,1$ г/л) и степень чистоты целевого белка после одной стадии ионообменной хроматографии ($89,1 \pm 2,5$ %) по сравнению с конститутивной системой ($20,1 \pm 1,5$ г/л и $75,4 \pm 3,2$ % соответственно; $p < 0,05$). Идентичность белка подтверждена методом хромато-масс-спектрометрии. Полученные результаты создают основу для дальнейшей разработки доступной вакцины против ВПЧ 18 типа на основе дрожжевой платформы *K. lactis* с потенциалом использования молочной сыворотки в качестве дешевой питательной среды.

Финансирование

Работа выполнена в рамках Государственного задания, тема ГЗ-28/26 «Дрожжевые системы культивирования для получения фармацевтических белков».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Liu F, Xu J, Yang R, Liu S, Hu S, Yan M, et al. New light on treatment of cervical cancer: Chinese medicine monomers can be effective for cervical cancer by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2023; 157: 114084. doi: 10.1016/j.biopha.2022.114084
2. Wu J, Jin Q, Zhang Y, Ji Y, Li J, Liu X, et al. Global burden of cervical cancer: current estimates, temporal trend and future projections based on the GLOBOCAN 2022.

Journal of the National Cancer Center. 2025; 5(3): 322–329. doi: 10.1016/j.jncc.2024.11.006

3. Афанасьев М.С., Душкин А.Д., Афанасьев С.С., Несвижский Ю.В., Гришачева Т.Г., Бирюкова Е.С. и др. Типовое разнообразие папилломавирусов человека высокого канцерогенного риска при клинических формах инфекции шейки матки в Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет*. 2025; 15(2): 271–286. [Afanasyev MS, Dushkin AD, Afanasyev SS, Nesvizhsky YV, Grishacheva TG, Biryukova ES, et al. Type profile of high oncogenic risk human papillomavirus in clinical forms of cervical infection in Russian Federation. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*. 2025; 15(2): 271–286. (In Russ.)]. doi: 10.15789/2220-7619-tpo-17690

4. Cascardi E, Cazzato G, Daniele A, Silvestris E, Cormio G, Di Vagno G, et al. Association between cervical microbiota and HPV: could this be the key to complete cervical cancer eradication? *Biology*. 2022; 11(8): 1114. doi: 10.3390/biology11081114

5. Zhou D, Xue J, Sun Y, Zhu L, Zhao M, Cui M, et al. Patterns of single and multiple HPV infections in female: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*. 2024; 10(17): e35736. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e35736

6. Wang R, Huang H, Yu C, Li X, Wang Y, Xie L. Current status and future directions for the development of human papillomavirus vaccines. *Frontiers in Immunology*. 2024; 15: 1362770. doi: 10.3389/fimmu.2024.1362770

7. Palatty PL, Sacheendran D, Jayachandran M. *Human Papilloma Virus Vaccines*. In: Baloh Z (ed.). *Confronting HPV: Insights and Solutions*. Books on Demand; 2025: 77–78. doi: 10.5772/intechopen.1004419

8. Brotherton JML, LaMontagne DS, Bloem PJN. Global status of HPV vaccination two decades in: effective, safe and preventing cancer. *Expert Rev Vaccines*. 2026; 25(1): 2609869. doi: 10.1080/14760584.2025.2609869

9. Shivakumar T, Das A, Bussoletti Panizo MV, Storch M, Thavarajah W, Freemont PS, et al. A Lactose-Based *Kluyveromyces lactis* Cell-Free Protein Synthesis System. *Chem Bio Eng*. 2025; 2(10): 602–611. doi: 10.1021/cbe.5c00011

10. Spohner SC, Schaum V, Quitmann H, Czermak P. *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 2016; 222: 104–116. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.023

11. Ohstrom AM, Buck AE, Du X, Wee J. Evaluation of *Kluyveromyces* spp. for conversion of lactose in different types of whey from dairy processing waste into ethanol. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14: 1208284. doi: 10.3389/fmicb.2023.1208284

12. Liao L, Shen X, Li J, Du G, Chen J, Zhang G. A dual strategy of metabolic engineering and multisite integration for enhanced lactase production in *Kluyveromyces lactis*. *Chemical Engineering Journal*. 2026; 531: 174271. doi: 10.1016/j.cej.2026.174271

13. Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR. Comet: an open source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics*. 2013; 13(1): 22–24. doi: 10.1002/pmic.201200439

14. Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts.

Methods in Molecular Biology. 2012; 824: 329–358. doi: 10.1007/978-1-61779-433-9_17

15. Porro D, Gasser B, Fossati T, Maurer M, Branduardi P, Sauer M, et al. Production of recombinant proteins in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 89(4): 939–948. doi: 10.1007/s00253-010-3019-z

16. Chen YM, Liu YuCh, Zhang GP, et al. Human papillomavirus L1 protein expressed in *Escherichia coli* self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Virus research*. 2016; 220: 97–103. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.017

17. Rosmeita CN, Budiarti S, Mustopa AZ, et al. Expression, purification, and characterization of self-assembled virus-like particles of capsid protein L1 HPV 52 in *Pichia pastoris* GS115. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2023; 21(1): 126. doi: 10.1186/s43141-023-00571-0

18. Gashti AB, Patel M, Chahal PS, et al. Purification and functional characterization of gag-spike virus-like particles: Process optimization for efficient vaccine production. *Vaccine*. 2025; 62: 127500. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.127500

19. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology*. 2004; 8(1): 33–41. doi: 10.1016/j.cbpa.2003.12.009

20. Sampaio FC, et al. Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: a combined approach to wastewater treatment and bioethanol production. *Environmental technology*. 2020; 41(24): 3210–3218. doi: 10.1080/09593330.2019.1604813

Сведения об авторах

Рар Анастасия Анатольевна – инженер-микробиолог отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: raranas@yandex.ru, rar_aa@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2652-8434>

Волосникова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Беленькая Светлана Валерьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: belenkaya_sv@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3883-6335>

Гогина Яна Станиславовна – старший научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: gogina_yas@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8986-0477>

Щербakov Дмитрий Николаевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: scherbakov_dn@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Information about the authors

Anastasiya A. Rar – microbiologist engineer of the Department of Technology Development and Pilot Production, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: raranas@yandex.ru, rar_aa@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2652-8434>

Ekaterina A. Volosnikova – Cand. Sc. (Biol.), lead research fellow of the Department of Technology Development and Pilot Production of biological products, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Svetlana V. Belenkaya – Cand. Sc. (Biol.), senior research fellow of the Department of Biophysics and Environmental Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: belenkaya_sv@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3883-6335>

Yana S. Gogina – senior research fellow of the Department of Technology Development and Pilot Production of Biological Products, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: gogina_yas@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8986-0477>

Dmitry N. Shcherbakov – Cand. Sc. (Biol.), lead research fellow of the Department of Biophysics and Environmental Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: scherbakov_dn@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Статья опубликована в рамках VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ», 22–24 июня 2026 г.