

# ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Flu-Chim, СОДЕРЖАЩЕГО ОСНОВНЫЕ ЭПИТОПЫ ВИРУСОВ ГРИППА А И В

И.В. Духовлинов<sup>1</sup>, О.А. Добровольская<sup>2</sup>, А.И. Орлов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ООО «Универсальные биосистемы», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Вирус гриппа вызывает высококонтагиозное заболевание людей, птиц и млекопитающих. Подсчитано, что ежегодно от эпидемий гриппа погибает от 250 000 до 500 000 человек и эта цифра может увеличиваться до 1 млн в период возможных пандемий вируса гриппа. Самым эффективным путем профилактики болезни или ее тяжелых последствий является вакцинация. На данный момент существует несколько подходов для создания противогриппозных вакцин, но они имеют ряд недостатков, которые снижают общую эффективность вакцинных препаратов. Соответственно, создание универсальной вакцины, способной обеспечить надежную защиту от существующих и возможных реассортантных штаммов вируса гриппа, на данный момент является приоритетной задачей. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и инактивированного. Данная работа посвящена получению высокоочищенного гибридного рекомбинантного белка, включающего фрагменты белков гемагглютинаина вирусов гриппа А и В, а также компоненты флагеллина в качестве адьюванта. Указанные фрагменты белков представляют собой консервативные части гемагглютининов Н1, Н3, Н5 и В, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов вирусов гриппа А и В. Выбранные участки белков наиболее иммуногенны. Их присутствие обеспечивает как В-клеточный, так и Т-клеточный иммунный ответ. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Гибридный белок, содержащий В- и Т-клеточные эпитопы разных субтипов вирусов гриппа А и В, а также флагеллин, позволят обеспечить сильный иммунный ответ при меньших затратах на производство. Нами был смоделирован гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim, содержащий иммуногенные эпитопы вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н5N1 и В, слитые с фрагментами флагеллина. Был создан высокопродуктивный штамм-продуцент, на основе клеток *E. coli* BL21(DE3). Была изучена экспрессия гибридного гена *flu-chim* при различных условиях индукции. Также был получен высокоочищенный гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim с использованием металлоафинной хроматографии. Чистота белка после финальной стадии очистки составила 98%. В дальнейшем планируется изучение иммунологических свойств полученного рекомбинантного белка.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, универсальная вакцина, рекомбинантный белок, гемагглютинин, иммуногенность, хроматография.

---

**Адрес для переписки:**

Добровольская Ольга Андреевна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 (812) 234-68-68.  
E-mail: dobrovolskay-oly@yandex.ru

**Contacts:**

Olga A. Dobrovolskaia  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Akademika Pavlova str., 12, Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-68-68.  
E-mail: dobrovolskay-oly@yandex.ru

---

**Библиографическое описание:**

Духовлинов И.В., Добровольская О.А., Орлов А.И. Получение гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim, содержащего основные эпитопы вирусов гриппа А и В // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 117–122. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-117-122

**Citation:**

Dukhovlinov I.V., Dobrovolskaya O.A., Orlov A.I. Production of hybrid recombinant protein Flu-Chim, containing influenza viruses A and B major epitopes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 117–122. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-117-122

## PRODUCTION OF HYBRID RECOMBINANT PROTEIN Flu-Chim, CONTAINING INFLUENZA VIRUSES A AND B MAJOR EPITOPES

Dukhovlinov I.V.<sup>a</sup>, Dobrovolskaia O.A.<sup>b</sup>, Orlov A.I.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> LLC ATG Service-Gene, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> LLC Universal Biosystems, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The influenza virus is highly contagious diseases of people, birds and mammals. Approximately 250 000–500 000 deaths are caused by influenza epidemics worldwide yearly, and the death number may be up to millions in a possible influenza pandemic. Vaccination is the most cost-effective way to reduce the considerable disease burden of seasonal influenza. Although seasonal influenza vaccines are effective, their performance in the elderly and immunocompromised individuals would benefit from improvement. Major problems related to the development and production of pandemic influenza vaccines are response time and production capacity as well as vaccine efficacy and safety. Reverse genetics techniques can speed up the generation of seed viruses and new mathematical modelling methods improve vaccine strain selection. Using vaccines based on recombinant proteins, we avoid the risks associated with the introduction of the virus into the body, even inactivated. In this paper, we have got a highly purified recombinant fusion protein composed of fragments of the hemagglutinin of influenza viruses A and B. As adjuvant we used components of flagellin. We used the most immunogenic and conserved areas of hemagglutinin H1, H3, H5 and B, which cause the formation of specific antibodies which can cross-react with homologous epitopes among the various strains of influenza A and B. Vaccine efficacy is increased by using multiple epitopes of various proteins. The aim of this study was to clone and express the hybrid recombinant protein Flu-Chim, containing immunogenic epitopes of influenza A/H1N1, A/H3N2, A/H5N1 and B fused with fragments of flagellin in *Escherichia coli* expression system and its subsequent purification. During the study was created high-yield *E. coli* strain, which produces the recombinant protein Flu-Chim, selected the optimal protocol of induction of the gene encoding the protein. The protein was purified using metal affinity chromatography. The purity of the final preparation reached 98%. In the future, we are going to study the immunogenic properties of the protein and use it as a component of the candidate vaccine against influenza.

**Key words:** influenza virus, universal vaccine, recombinant proteins, hemagglutinin, immunogenicity, chromatography.

## Введение

Вирусы гриппа относятся к группе возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). В России на долю ОРВИ ежегодно приходится до 90% от всех регистрируемых инфекционных заболеваний. Эпидемии гриппа могут оказывать серьезное воздействие на все возрастные группы населения, но наибольший риск развития осложнений отмечен у детей до двух лет и у взрослых в возрасте 65 лет и старше, а также людям с хроническими заболеваниями или с ослабленной иммунной системой. По данным Минздрава РФ, ежегодные экономические потери, связанные с эпидемиями гриппа, составляют около 85% от всего ущерба, наносимого инфекционными болезнями [1, 5, 12].

Всемирной организацией здравоохранения в качестве основного средства борьбы против гриппа в настоящее время рекомендована вакцинация, которая наиболее эффективна в тех случаях, когда циркулирующие в популяции вирусные штаммы в значительной мере соответствуют штаммам, заложенным в состав вакцины. Однако существует опасность пандемического распространения отдельных штаммов вируса гриппа, комбинация генов которых ранее не встречалась в популяции. Наибольшее

эпидемическое значение имеют вирусы гриппа А и В. Непредсказуемость эпидемий обусловлена антигенной изменчивостью вирусов гриппа А, приводящей к частичному или полному изменению групповых и штаммовых детерминант — гемагглютинина и нейраминидазы [9].

Важнейшей проблемой существующих в настоящее время вакцин против гриппа является их узкая специфичность и необходимость ежегодного обновления штаммового состава вакцины. Именно это является причиной пристального внимания мирового научного сообщества к разработке универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Такие универсальные вакцины призваны обеспечить защиту против любого серотипа вируса гриппа А, в результате чего отпадает необходимость в ежегодной вакцинации, и, как следствие этого, существенно снижаются затраты на производство профилактических противогриппозных вакцин. В связи с этим создание универсальной вакцины, которая защищала бы от широкого спектра вирусов гриппа А и, особенно, пандемически опасных штаммов, ранее не циркулировавших среди людей, является весьма актуальной задачей [3]. Использование вакцин на основе ре-

комбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и инактивированного.

На данный момент разработано несколько кандидатных универсальных вакцин против гриппа. Так, известна кандидатная вакцина, в которой в составе векторной конструкции используется ген, кодирующий мультиэпитопный гемагглютинин вируса гриппа птиц; данная конструкция оптимизирована для получения в клетках растений [4]. Также в ряде работ были использованы бакуловирусные конструкции для экспрессии гемагглютинина вирусов гриппа А или В в клетках насекомых [13]. Недостатками подобных подходов является использование последовательности белка (гемагглютинина) только одного субтипа вируса гриппа, что ограничивает спектр активностей вакцины. Также экспрессия в растениях и в клетках насекомых обеспечивает низкий выход белка, по сравнению с экспрессией в клетках *E. coli*.

Также известен ряд работ, в которых используют поливалентный противогриппозный антиген, адъювант и агент, обеспечивающий проникновение вакцины. В качестве антигенной компоненты заявлены любые из Н1-Н16 и N1-N9 [11]. Также известна поливалентная вакцина против гриппа, антигенной компонентой которой являются поверхностные белки вирусов А/Н1N1, А/Н3N2, гемагглютинин В-типа, в качестве адъюванта в этой работе использовали глицерол или гидроксид алюминия [7].

Данная работа посвящена получению высокоочищенного гибридного рекомбинантного белка, включающего фрагменты белков Н1, Н3, Н5 вируса гриппа А, а также фрагмент гемагглютинина вируса гриппа В, а также компоненты флагеллина в качестве адъюванта. Перечисленные фрагменты белков представляют собой консервативные части гемагглютининов Н1, Н3, Н5 и В, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов вирусов гриппа А и В. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Использование слитого белка, содержащего В- и Т-клеточные эпитопы разных субтипов вирусов гриппа А и В, а также флагеллин, позволит обеспечить сильный иммунный ответ при меньших затратах на производство. Целесообразно использование лишь компонентов флагеллина. На данный момент флагеллин является одним из наиболее перспективных и хо-

рошо изученных адъювантов нового поколения. Результаты исследований показывают, что рекомбинантные белки, вводимые с компонентами флагеллина, имеют повышенные иммуногенные и антигенные характеристики. Последние вызывают формирование более сильного клеточного и гуморального иммунного ответа, который регистрируется в более короткие сроки [2].

Использование антигенных детерминант в гибридной конструкции и только одного типа белка (гемагглютинина) позволяет упростить и удешевить процесс производства вакцины, поскольку отпадает необходимость дополнительного подбора условий и контроля качества производства компонентов.

## Материалы и методы

### Синтез и клонирование гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim

Перевели аминокислотную последовательность гибридного белка Flu-Chim, включающего фрагменты FliC1, FliC2, Н1, Н3, Н5, В, в нуклеотидную (1785 п.н.), кодонно оптимизировав последнюю для экспрессии в клетках *E. coli*. Синтез данной нуклеотидной последовательности осуществляли путем удлинения взаимоперекрывающихся олигонуклеотидов согласно описанным методам [8]. Олигонуклеотиды представляли собой фрагменты гибридного гена длиной около 70 нуклеотидов со взаимоперекрывающимися участками длиной около 20 нуклеотидов. В общей сложности для синтеза гибридного гена длиной 1785 п.н. было использовано 65 праймеров. Синтезированные фрагменты по 300 п.н. выделяли с помощью гель-электрофореза и клонировали в плазмидном векторе pGEM-T Easy. Клонирование осуществляли с использованием рестрикционных сайтов KpnI, SacII, EcoRV, BamHI или посредством «тупых» концов. После секвенирования фрагменты амплифицировали, после чего соединяли в нуклеотидную последовательность гибридного белка путем их сплавления методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). После заключительного этапа синтеза гибридного гена путем лигирования фрагментов данный искусственный ген, *flu-chim*, клонировали в векторе pGEM-T по рестрикционным сайтам KpnI и SacI. Далее ген *flu-chim* амплифицировали с использованием ПЦР и праймеров, в состав которых введены рестрикционные сайты EcoRI, для замены соответствующего сайта рестрикции на 5'-конце, и XhoI — на 3'-конце гена. Далее наработанный ПЦР-фрагмент и экспрессионный вектор pET28a(+) обрабатывали рестриктазами EcoRI и XhoI и лигировали. Осуществляли трансформацию клеток

*Escherichia coli* DH10B/R (Invitrogen, США) полученной лигазной смесью методом электропорации с дальнейшим высевом на селективную питательную среду. Осуществляли скрининг клонов. Выделенную плазмидную ДНК проверяли с помощью ПЦР и рестрикционного анализа с последующим проведением электрофореза в агарозном геле.

В ходе работы были отобраны клоны клеток *E. coli*, содержащие фрагменты ДНК требуемого размера в составе плазмиды, из которых такие плазмиды, pET28a(+)-flu-chim, были выделены для создания штамма *E. coli* для дальнейшей экспрессии гибридного гена.

### Создание штамма-продуцента гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim

Для создания штамма-продуцента гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США). Трансформацию компетентных клеток плазмидой pET28a(+)-flu-chim осуществляли методом электропорации.

Для быстрого скрининга рекомбинантных клонов *E. coli* на наличие плазмид pET28a(+)-flu-chim плазмидную ДНК выделяли из 2 мл культуры и анализировали электрофорезом в агарозном геле. Для проверки наличия вставки целевого гена в плазидах проводили секвенирование.

### Индукция экспрессии гена flu-chim

Осуществляли подбор оптимального протокола индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный белок Flu-Chim. Для этого проводили индукцию экспрессии гена двумя способами — с помощью изопропил-β-D-1-тиогактопиранозиды (ИПТГ) в трех концентрациях и 0,2% лактозы (по Штудиеру) [14].

Индукцию экспрессии гибридного гена ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение ночи в LB среде (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0,6–0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии рекомбинантного гена с помощью добавления ИПТГ к культуре до конечной концентрации 0,1; 0,5 или 1 мМ. Оставляли на 10 ч для определения оптимального уровня экспрессии гена, после чего клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Индукцию экспрессии гибридного гена 0,2% лактозой (по Штудиеру) осуществляли следующим образом. В среду RYP-5052, содержащую 1% пептон (Gibco, США), 0,5% дрожжевой экстракт (Gibco, США), 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,5% глицерол, 0,05% глюкозу и 0,2% лактозу, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. После ферментирования при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение 20 ч до отсутствия существенного изменения ОП600 за 1 ч. Далее отбирали аликвоту клеток на анализ. Контроль экспрессии осуществляли с помощью диск-электрофореза аликвот клеток после индукции. Электрофорез клеточных лизатов проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с использованием на стадии концентрирования образца механизма изотахофореза по Леммли [6].

### Очистка гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim

Очистку гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim проводили с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ сефарозы [10]. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка.

Клетки продуцента лизировали с помощью 5 циклов соникации по 30 с с перерывом в 2 мин на льду. Затем проводили разрушение телец включения путем инкубации в течение часа с лизирующим буфером, содержащим 500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 6 М гуанидина гидрохлорида, 500 мМ хлористого натрия.

Колонка, содержащая Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивалась буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористого натрия, 10 мМ имидазола). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения. После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористого натрия, 30 мМ имидазола). Элюировали белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористого натрия, 200 мМ имидазола). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли по методу Лоури.

## Результаты

Нами был смоделирован гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim, содержащий иммуногенные эпитопы вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н5N1 и В, слитые с фрагментами флагеллина. Анализ аминокислотных последовательностей данного белка с помощью программы ProtParam показал, что гибридный белок стабилен и имеет молекулярную массу 63,6 kDa, pI 6,2.

Создан штамм-продуцент, на основе клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированный вектором pET28a(+)*flu-chim*. С использованием секвенирования показано, что данный вектор в составе штамма несет ген гибридного белка Flu-Chim.

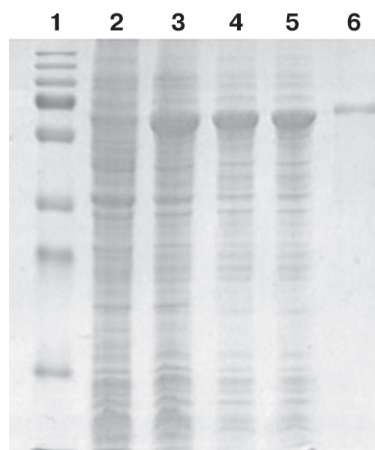
Также была изучена экспрессия гибридного гена *flu-chim* при индукции 0,1; 0,5 и 1 мМ ИПТГ, а также 0,2% лактозой по Штудиеру (рис.). Наблюдали экспрессию гибридного гена *flu-chim* при всех вариантах индукции. Подобран оптимальный по выходу белка и затратам на его осуществление протокол индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim — метод автоиндукции.

Получен высокоочищенный гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim с использованием металлоаффинной хроматографии с Ni-NTA сефарозой (рис.). Выход белка составил 79 мг из одного литра жидкой культуры.

## Обсуждение

Вирус гриппа встречается повсеместно, по распространенности занимает ведущее место среди инфекционных болезней человека. В России ежегодно болеют гриппом около 30 млн человек. За последние десять веков человечество подвергалось более чем 130 эпидемиям и пандемиям гриппа. Вирусы гриппа циркулируют во всех частях мира. На данный момент вакцинация признана наиболее эффективным средством профилактики вируса гриппа. Несовершенство и низкая эффективность существующих вакцин побуждает научное сообщество к разработке новых профилактических средств против данного заболевания, характеризующихся в первую очередь универсальностью.

Полученный высокоочищенный гибридный белок включает фрагменты белков Н1, Н3, Н5 вируса гриппа А, а также фрагмент гемагглютинина вируса гриппа В, а также компоненты флагеллина — FliC1 и FliC2 в качестве адьюванта; компоненты соединены гибкими мостиками. Указанные фрагменты белков представляют собой консервативные части гемагглютининов Н1, Н3, Н5 и В, к которым в процессе естественной инфекции образуются



**Рисунок. Электрофореграмма результатов индукции экспрессии гена *flu-chim* и хроматографической очистки белка Flu-Chim**

Figure. Recombinant Flu-Chim fusion protein expression and purification analysis by SDS PAGE

1. Маркер молекулярных масс (Fermentas)
2. Отрицательный контроль индукции экспрессии гена *flu-chim*
3. Индукция экспрессии гена *flu-chim* 0,2% лактозой
4. Индукция экспрессии гена *flu-chim* 0,5 мМ ИПТГ
5. Индукция экспрессии гена *flu-chim* 1 мМ ИПТГ
6. Препарат очищенного рекомбинантного белка Flu-Chim

специфичные антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов вирусов гриппа А и В. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа.

Использование полученного гибридного рекомбинантного белка при создании кандидатной вакцины против вируса гриппа позволит увеличить ее валентность: после вакцинации у человека возможна выработка специфичного иммунного ответа к различным субтипам вирусов гриппа А и В, как существующим, так и тем, которые могут появиться в результате реассортации нескольких штаммов вируса гриппа.

Целью исследования являлось создание вакцины, которая, наряду с высокой эффективностью, обладала бы относительной безопасностью применения. Для реализации поставленной цели был разработан и создан активный агент кандидатной вакцины против вируса гриппа типов А и В — гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim.

Для получения высокоочищенного белка Flu-Chim в больших количествах при малых затратах осуществлен ряд действий.

Получен оптимизированный для высокой экспрессии в клетках *E. coli* ген, кодирующий гибридный белок Flu-Chim. Создан экспрессионный вектор pET-28a(+)-flu-chim.

Создан штамм *E. coli* DH10B/RpET-28a(+)-flu-chim для амплификации вектора, несущего ген *flu-chim*. Создан высокопродуктивный штамм *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a(+)-flu-chim — продуцент белка Flu-Chim. Подобран прото-

кол индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный белок Flu-Chim, обеспечивающий высокий выход белка при наименьших затратах — индукция 0,2% лактозой по Штудьеру. Нароботаны и очищены с использованием металлоаффинной хроматографии образцы рекомбинантного белка Flu-Chim. В дальнейшем планируется оценить иммуногенные и протективные свойства созданного гибридного рекомбинантного белка, что позволит использовать его в составе кандидатной вакцины против вируса гриппа типа А и В.

## Список литературы/References

1. Эпидемиологическая ситуация. ФГБУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения России, 2016. [Epidemiologicheskaya situatsiya [Epidemic Situation]. Research Institute of Influenza, Ministry of healthcare of the Russian Federation, 2016]. URL: [http://www.influenza.spb.ru/en/influenza\\_surveillance\\_system\\_in\\_russia/epidemic\\_situation](http://www.influenza.spb.ru/en/influenza_surveillance_system_in_russia/epidemic_situation) (05.04.2017)
2. Balaram P., Kien P.K., Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 299, no. 3, pp. 177–185.
3. Griffin M.R. Influenza vaccination: a 21<sup>st</sup> century dilemma. *S. D. Med.*, 2013, special no., pp. 110–118.
4. Henry M., Larrinua I.M., Russell S.M. Novel DNA sequences, vectors and proteins of avian influenza hemagglutinin: pat. US20090106864 A1, April 23, 2009.
5. Influenza. Surveillance and monitoring. *World Health Organization*, 2016.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
7. Li S., Zhu W. Influenza-pandemic influenza bivalent combined vaccine and preparation method thereof: pat. CN101524538 A USA.
8. Majumder K. Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene*, 1992, vol. 110, no. 1, pp. 89–94.
9. McCullers J.A. The role of punctuated evolution in the pathogenicity of influenza viruses. *Microbiol. Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 2.
10. Ni-NTA purification system. User manual. Catalog nos. K950-01, K951-01, K952-01, K953-01, K954-01, R901-01, R901-10, R901-15. Version C. 25-0496. *Invitrogen*, 2006.
11. Penghui Y., Xiliang W., Deyan L., Yueqiang D., Li X., Jincheng W. Transdermal immune influenza multivalent vaccine and preparation method thereof: pat. CN101450209 B USA. China.
12. Situation Update: Summary of Weekly FluView Report. *Centers for Disease Control and Prevention*, 2016.
13. Smith G.E., Volvovitz F., Wilkinson B.E., Hackett C.S. Method for producing influenza hemagglutinin multivalent vaccines using baculovirus: pat. US5762939 A USA.
14. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 2005. vol. 41, no. 1. pp. 207–234.

### Авторы:

**Духовлинов И.В.**, к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;  
**Добровольская О.А.**, аспирант ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Орлов А.И.**, д.х.н., генеральный директор ООО «Универсальные биосистемы», Санкт-Петербург, Россия.

### Authors:

**Dukhovlinov I.V.**, PhD (Biology), Director of Science, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Dobrovolskaya O.A.**, PhD Student, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Orlov A.I.**, PhD, MD (Chemistry), General Director, LLC “Universal Biosystems”, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.02.2017  
 Отправлена на доработку 03.03.2017  
 Принята к печати 07.04.2017

Received 26.02.2017  
 Revision received 03.03.2017  
 Accepted 07.04.2017