



УДК 57.084.1+578.74

Растительные экспрессионные системы для создания пероральных вакцин против опасных инфекционных заболеваний

Р. К. Салаяев¹, Н. И. Рекославская¹, А. С. Столбиков^{1,2},
А. В. Третьякова^{1,2}, С. Н. Осипенко¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Аннотация. Разработка растительных пероральных вакцин оказалась возможной при создании растительных экспрессионных систем, обладающих рядом преимуществ по сравнению с другими экспрессионными системами: относительная дешевизна получения растительных вакцин, широкие возможности коммерциализации и масштабирования, безопасность вследствие отсутствия патогенов млекопитающих, прионов, транспозонов, опасных вирусов в латентном состоянии.

Рассмотрены пути создания профилактических и терапевтических вакцин на основе трансгенных растений против высокоинфекционных вирусных заболеваний: ВИЧ, гепатита В, онкогенных папилломавирусов и т. д. В основе создания превентивных вакцин лежит формирование высокоиммунного нейтрализующего антигенного ответа широкого захвата вирусных эпитопов. Принцип создания терапевтических вакцин состоит в активации Т-лимфоцитов с доменами CD8+ (Т-лимфоциты – «киллеры») и CD4+ (Т-лимфоциты – «хелперы»), приводящей к узнаванию опухолевых клеток и их апоптозу. В процессе активации «незаряженных» («наивных») Т-лимфоцитов принимают участие дендритные клетки мукозальных поверхностей органов и компоненты главного комплекса гистосовместимости (МНС). Особое внимание уделено способам создания генетических конструкций, обеспечивающих высокую экспрессию целевых генов и синтез антигенных белков. Коммерчески востребованными являются способы трансформации растений, которые позволяют в короткий срок синтезировать большие количества антигенных вирусных белков с минимальными затратами на выделение и очистку. Этим требованиям отвечают растительные экспрессионные системы на основе простых РНК+ вирусов растений с привлечением регуляторных генов и разнообразных генетических элементов вирусов, способствующих более эффективной трансляции вследствие удлинения срока использования матрицы РНК и повышению выхода целевых антигенных белков: репликазы, антисайленсеры, лидерные вирусные последовательности, «ловушки» и «шунты» рибосом и др.

Ключевые слова: растительные экспрессионные системы, пероральные вакцины на основе трансгенных растений, индукция иммунного ответа, профилактические и терапевтические вакцины

Пероральные растительные вакцины возникли как часть более объемной проблемы – получение препаратов медико-биологического назначения при помощи генной инженерии – биофарминга, что в последнее десятилетие позволило осуществить переход к растительным экспрессионным системам. Производство целого ряда белковых продуктов, полученных в растительных организмах или их клеточных культурах (коллаген человека тип I из табака, бычий трипсин из кукурузы, лизоцим и лактоферрин человека из риса и целый ряд других рекомбинантных белков) уже поставлено на коммерческую основу [24].

В основе разработки инновационных профилактических и терапевтических растительных вакцин лежит генетическая трансформация растений различными методами, в том числе путём агробактериальной трансформации при помощи граммотрицательной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, в плазмиду которой вводятся генетические конструкции с целевыми и регуляторными генами. Благодаря присущей *A. tumefaciens* природной способности к переносу ДНК в растения оказалось возможным успешно переносить в растительный организм нужные целевые гены.

Методология агробактериального переноса рекомбинантной ТДНК в растения постоянно и успешно развивается и к настоящему времени созданы различные трансгенные растения, продуцирующие не менее 100 важных белков, полезных для человека: гормон роста, сывороточный альбумин, эпидермальный ростовой фактор, α -интерферон, гирудин, эритропоэтин, глюкоцереброзидаза, α - и β -гемоглобины, интерлейкин-2 и интерлейкин-4, α 1-антитрипсин, лактоферрин и целый ряд других соединений [9]. С помощью трансгенных растений, синтезирующих целевые антигенные белки, уже создано значительное количество инновационных вакцин.

Агробактериальная трансформация растений для разработки вакцин. Классическая агробактериальная трансформация, стабильно наследуемая в поколениях, состоит в инсерции одной копии ТДНК в геном хозяйского растения и последующей экспрессии, которая наследуется в поколениях. Стабильность инсерции в составе генома растения-хозяина поддерживается селекцией при выращивании эксплантов следующих семенных поколений на средах с высоким содержанием селективного антибиотика. В наших экспериментах мы получали трансгенные растения, синтезирующие чужеродные белки вплоть до 10-го семенного поколения, подвергая их проростки строгому селективному отбору на средах с канамицином.

Инициатива создания пероральных вакцин на основе трансгенных растений с целью профилактики детей против гепатита В появилась в 1983 г. [17]. Гепатит В по-прежнему сохраняет свой статус опасного инфекционного заболевания несмотря на использование в течение 30 лет инъекционной вакцины. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) оценивает число людей, хронически больных вирусом гепатита В, в 257 млн, из которых более чем 887 тыс. человек умирают каждый год из-за сопутствующих осложнений, включающих цирроз и рак печени [18]. Инъекционное вакцинирование охватывает только часть (около 20 %) иммунной системы, поэтому при

инъекции вакцины большая часть возбудителей оказывается не подверженной иммунному ответу и «ускользает» от встречи с нейтрализующими специфическими антителами.

Безигольное вакцинирование представляет обоснованную альтернативу инъекционному, поскольку, по данным ВОЗ, инъекционное вакцинирование вызвало до 15 млн случаев заражения гепатитом В, 1 млн заражения гепатитом С, 340 тыс. заражения ВИЧ, 3 млн бактериальных инфекций и 850 тыс. случаев инфекций, приводящих к абсцессам [18].

Инициатива создания профилактических пероральных вакцин вызвала большой интерес и получила широкое развитие. Оказалось, что трансгенные растения с введённым целевым геном способны успешно синтезировать многие антигенные белки разных опасных вирусных и бактериальных инфекций. За 20 лет после провозглашения инициативы создания пероральных, или, как их вначале называли, «съедобных» вакцин, было разработано примерно 700 профилактических кандидатных растительных вакцин против таких возбудителей, как энтеропатогенная *E. coli*, холера, малярийный плазмодий, золотистый стафилококк, возбудитель пневмонии пастереллёза, некоторые гепатиты, вирусы иммунодефицита, кори, краснухи, ротавирус, риновирус, вирусы Норволка, респираторного синцития, бешенства, ящура, сибирской язвы, цитомегаловируса и других [23]. Около 20 растительных вакцин были одобрены Управлением по санитарному надзору США (FDA) для применения на людях, среди них вакцины против холеры, гепатита В, бешенства, сезонного и пандемического гриппа.

Трансгенные растения на основе ядерной трансформации обычно производят малое количество чужеродных целевых белков, несмотря на то, что известны примеры высокой экспрессии чужеродных белков (фитазы в табаке (14 % от содержания общего растворимого белка (ОРБ)) или зубактериальной глюканазы в арабидопсисе (26 % от ОРБ)). Как правило, однако, обычная ядерная трансформация обеспечивает продукцию чужеродных целевых белков в трансгенных растениях в пределах 0,01 % от ОРБ. Например, В-субъединица термолабильного энтеротоксина *E. coli* LTВ – 0,01 % ОРБ, белок оболочки вируса гепатита В (ВГВ) – 0,01 % ОРБ, гликопротеин В цитомегаловируса человека – 0,02 % ОРБ, гликопротеин S коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита – 0,06 % ОРБ, сывороточный альбумин человека – 0,02 % ОРБ, белок С комплемента человека – 0,001 % ОРБ, эпидермальный ростовой фактор человека – 0,0001 % ОРБ, эритропоэтин – 0,026 % ОРБ, β-интерферон человека – 0,000017 % от сырого веса [20; 23].

В наших исследованиях при разработке кандидатной вакцины против гепатита В и ВИЧ выход антигенных белков в трансгенных растениях также составлял 0,00001 % от ОРБ [14].

Однако, несмотря на малую продуктивность антигенных белков, практически все растительные вакцины были иммуноактивными, способными активировать иммунный ответ у подопытных животных и даже у добровольцев. Самым значительным результатом этих экспериментов было то, что даже при концентрациях от 0,00001 до 0,000001 % от сырого веса синте-

зированные в растениях антигенные белки проявляли как иммуногенные, так и протективные свойства [23]. Затем было выяснено, что растительные вакцины способны вызывать как мукозальный, так и общий системный иммунный ответ у млекопитающих.

Причинами малой продуктивности стандартной агробактериальной трансформации могут быть инсерция одной копии ТДНК, что не способствует высокой продуктивности синтеза антигенного белка на единицу массы растения, либо влияние возникающих при использовании вирусных генов в экспрессионной конструкции и их интеграции в геном растения-хозяина эпигенетических нарушений, приводящих к химеризации и сайленсингу. Последнее явление хорошо охарактеризовано в настоящее время как РНК-интерференция, приводящая к вирус-индуцированному замолчанию генов (virus induced gene silencing (VIGS)) и функционирует в природе как защитный противовирусный механизм [26].

В 2001–2007 гг. авторы в сотрудничестве с ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» и Институтом химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБиФМ) СО РАН разработали растительные профилактические вакцины против некоторых опасных заболеваний, в частности, впервые были получены кандидатная бинарная вакцина против ВИЧ и гепатита В на основе химерного гена TBI-HBS [2] и моновалентная вакцина против гепатита В на основе белка оболочки PreS2-S [4].

При создании этих вакцин была использована классическая агробактериальная трансформация, которая обеспечивает инсерцию одной копии целевого гена в геном трансформируемого растения и его экспрессию, причём эта экспрессионная система не была защищена от РНК-интерференции. Поэтому при разработке бинарной вакцины с TBI-HBS выход продуцируемого антигенного белка был не очень высок: для антигена р24 ВИЧ он составил 0,3–2,0 нг/мг ОРБ, а для антигенного белка оболочки HBS – 70–130 нг/мг ОРБ. При этом метод Нозерн-дот-блот-гибридизации с применением радиоактивного зонда показал высокую интенсивность синтеза РНК в препаратах (рис. 1). Очевидно, в данном случае высокой продукции антигенного белка TBI-HBS препятствовал эффект сайленсинга.

На таком уровне синтез антигенного белка TBI-HBS был прослежен нами в семи семенных поколениях при соблюдении строгого селективного отбора эксплантов на среде МС с 100 мг/л канамицина [5]. Это свидетельствует о стабильной трансформации трансгенных по гену TBI-HBS растений томата [2].

При разработке моновалентной вакцины против вируса гепатита В с помощью строгого селективного отбора на питательной среде МС, содержащей 100 мг/л канамицина, удалось повысить выход антигенного белка PreS2-S до 211–297 нг/мг ОРБ, т. е. до 0,002–0,003 % ОРБ.

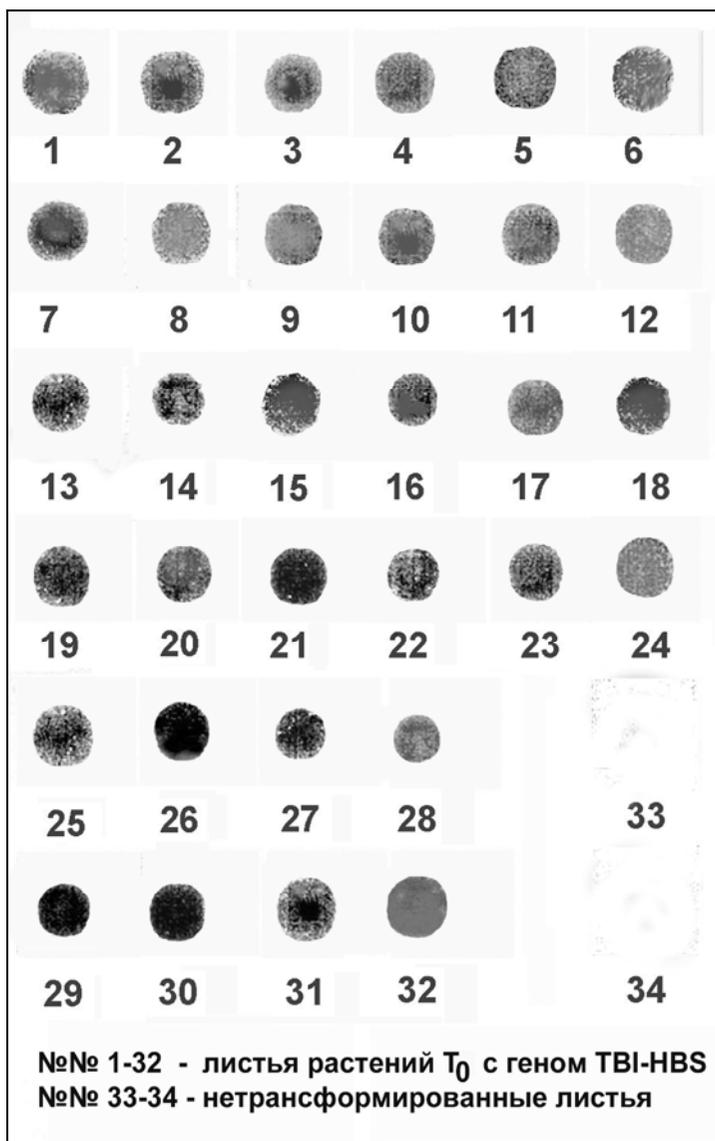


Рис.1. Результаты Нозерн-дот-блот-гибридизации РНК из трансгенных растений с зондом, приготовленным с ^{32}P -АТФ и плазмиды рTBI-HBS

Обе вакцины были испытаны на лабораторных животных и вызывали высокий и длительный иммунный ответ, обеспечивающий превентивность [2; 4].

Создание генетических конструкций с применением вирусных регуляторных элементов при разработке вакцин. Использование генно-инженерных конструкций со вставками растительных вирусов давно привлекало внимание из-за высокой потенциальной продуктивности в синтезе гетерологичных белков. Но вследствие того, что в 80–90-е гг. XX в. наиг-

лавнейшей задачей считалось получение трансгенных растений со стабильным наследованием трансгенов, в которых благодаря селективному отбору проростков на средах с антибиотиками увеличивалась бы способность к высокой продуктивности целевых белков, использование генетических конструкций на основе растительных вирусов не получало широкого признания. Это было связано с тем, что потомство таких растений было нестабильным, если вообще получали растения в последующих генерациях. В 2000-х годах биотехнология подверглась коммерциализации и создавать поколения трансгенных растений оказалось экономически маловыгодным. Поэтому включение регуляторных элементов растительных вирусов и создание экспрессионных растительных векторов на их основе существенно усиливало продукционную эффективность трансгенных растений.

Использование омега лидера 5' нетранслируемой области РНК+ ВТМ для усиления продукции антигенного белка L1 оболочки папилломавируса высокоонкогенного типа 16. В наших работах по созданию кандидатной вакцины против цервикального рака использовались также регуляторные элементы растительных вирусов, в частности, трансляционный усилитель (энхансер) РНК+ вируса табачной мозаики Ω 5'НТО ВТМ (рис. 2).

При создании растительной продукционной системы для синтеза антигенного белка папилломавируса высокоонкогенного типа HPV16 L1 под контролем промотора p35S вируса мозаики цветной капусты нами использовалась последовательность омега лидера (трансляционного энхансера) РНК + вируса мозаики табака (Ω 5'НТО ВТМ).

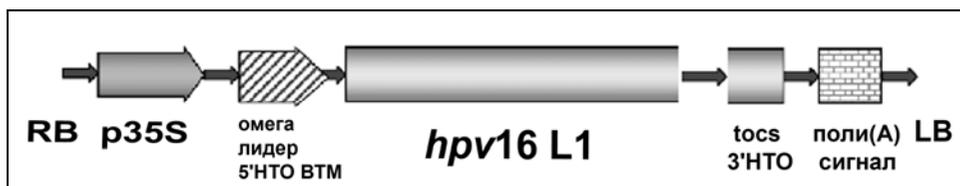


Рис. 2. Генетическая конструкция для трансформации плодов томата геном HPV16 L1 с трансляционным энхансером омега лидером РНК+ Ω 5'НТО ВТМ. Сокращения: RB – right border, правая направляющая граница ТДНК агробактерии; p35S – промотор гена, кодирующего РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV) с константой седиментации 35S; Ω 5'НТО ВТМ – лидерная последовательность (первые 68 нуклеотидов) РНК+ вируса табачной мозаики в 5' нетранслируемой области; hpv16 L1 – последовательность «позднего» гена, кодирующего главный белок оболочки L вируса папилломы человека высокоонкогенного типа 16; tocs – терминатор гена, кодирующего синтез октопинсинтазы агробактерии; 3'НТО – 3' нетранслируемая область; поли(А)-сигнал – последовательность в 3' нетранслируемой области с консенсусом ААТААА, сигнализирующим синтез поли(А)-последовательности мРНК первичного транскрипта данного гена; LB – left border, левая граница ТДНК

Последовательность Ω 5'НТО ВТМ состоит из 68 пар нуклеотидов: GUAUUUUUACAACAUAUACCAACAACAACAACAACAACAACAACAUAUACAUAUUUACAUAUACA [9]. Омега лидер ВТМ является высокоэффективным усилителем трансляции вследствие уникальности структуры, отличающейся следующими особенностями: 1 – центральная (коровая) часть состоит из 10 повторов цитидиловых и адениловых остатков САА, составляющих примерно половину всей последовательности лидера; 2 – повторяющиеся САА остатки формируют стабильную тройную спираль, отличающуюся от канонического спаривания по Уотсону и Крику, так как в ней почти отсутствуют гуаниловые остатки, а вместо этого С:А и А:А связаны одной водородной связью; 3 – лидерная последовательность с помощью тройной спирали и АU-обогащенной 3'-концевой части может связываться с 80S и 40S рибосомами и усиливать трансляцию. Омега лидер ВТМ способен усиливать трансляцию с гомологичных или гетерологичных РНК в животных и растительных клетках различного типа, а также в бесклеточных системах [3].

Для количественного определения использовали иммуноферментный анализ плодов томата с введённой в них суспензией *A. tumefaciens* с рVINHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ. После инкубации в течение 22 суток из трансформированных плодов удаляли семена, плоды лиофилизировали. Показатели содержания антигенного белка HPV16 L1 в лиофильно высушенном материале (рис. 3) демонстрируют, что все индивидуально трансформированные плоды содержали примерно одинаковое (около 2 330 нг на 1 мг общего растворимого белка) количество антигенного белка. Сайленсинга, химеризма или разнокачественного синтеза антигенного белка HPV16 L1 в трансформированных плодах не наблюдалось.

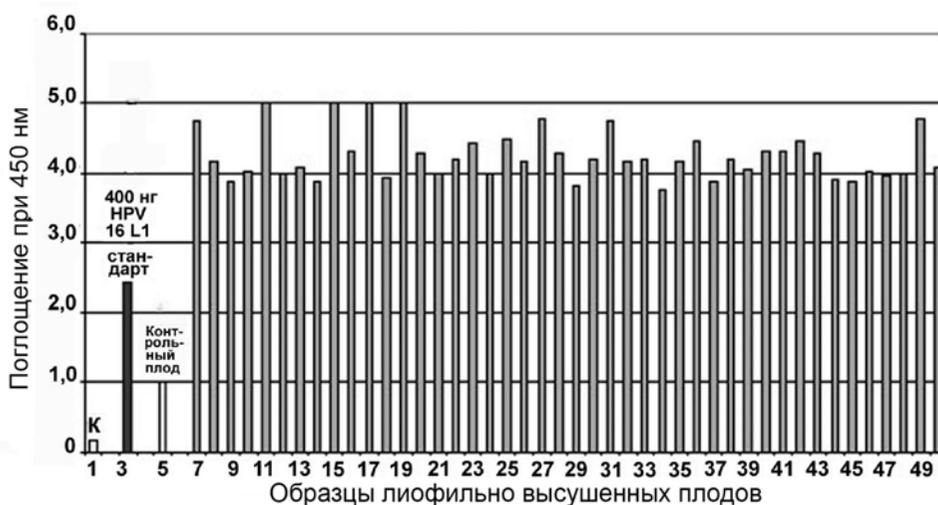


Рис. 3. Содержание антигенного белка HPV16 L1 в лиофильно высушенном материале индивидуальных плодов томата после трансформации *A. tumefaciens* с рVINHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ. К – отрицательный контроль

Следовательно, при использовании для трансформации в данном случае гена HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ существенно усиливается стабильность экспрессии целевого гена и повышается выход целевого белка. Этот вакцинный материал был использован для индукции иммунного ответа у лабораторных мышей, который оказался высоким и стабильным на протяжении 315 суток после вакцинации (рис. 4).

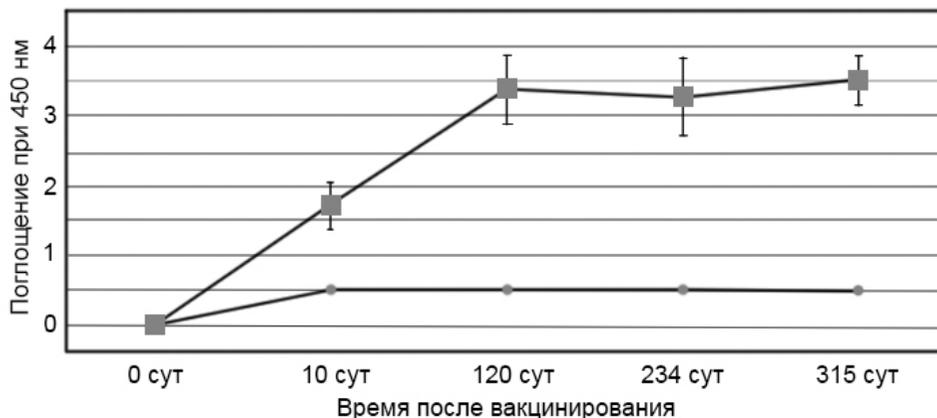


Рис. 4. Динамика содержания антител в сыворотке крови мышей, перорально вакцинированных лиофилизированным материалом трансформированных плодов томата в течение 315 сут.

Использование репликазы или РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) растительных вирусов для увеличения продукции антигенных белков. Недостатком конструкций на основе растительных вирусов являлась их нестабильность. Поэтому в последнее десятилетие большой интерес вызывают работы с использованием «деструктивных» растительных вирусов равно как РНК-вирусов, так и ДНК-вирусов для продукции антигенных белков, антител и терапевтических белков (ферментов) [15]. В этих работах используют весьма эффективный вирусный фермент репликазу или РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), последовательность которой помещают в генетические конструкции совместно с целевым геном. При этом используют промотор вируса мозаики цветной капусты р35S CaMV, который способен транскрибировать полицистронные последовательности генов, а также способствует эписомальной экспрессии целевых белков в растениях. Репликаза RdRP после синтеза первичного транскрипта и первого этапа трансляции, который, как полагают, происходит в ядре, выходит в цитоплазму готовым эффективным ферментом и начинает процесс репликации последовательностей, следующих за ней. Образуется большое количество ампликонов, которые, благодаря промотору р35S, замыкаются в кольцо и таким образом формируется большое количество реплисом, служащих матрицами для синтеза антигенных или других целевых белков. Ис-

пользование растительного белоксинтезирующего аппарата происходит с такой скоростью, что через 3–4 дня количество целевого гетерологичного белка может достигнуть нескольких микрограммов на 1 г сырого веса, но к 7-м суткам растение обычно уже погибает.

Появление вирусных последовательностей в растительной клетке вызывает явление РНК-интерференции, поэтому в генетическую конструкцию целесообразно вставлять сегменты генома, кодирующие белки-антисайленсеры, подавляющие РНК-интерференцию. Это приведёт к увеличению выхода синтезируемого антигенного или другого целевого белка.

Таким образом, использование растительных вирусных экспрессионных векторов в значительной мере способствует резкому увеличению количества антигенных белков в вакцинном материале, иногда даже превышающему эффективность обсуждаемого ниже метода *biolistic*.

В исследованиях, связанных с разработкой противораковых вакцин, мы также использовали генетические конструкции с введёнными в них генами, кодирующими синтез РНК-зависимой РНК-полимеразы (рис. 5, Б, 3). Результаты такого подхода показали, что применение для генетической трансформации томата конструкций с RdRP значительно увеличило количество антигенного белка наиболее высокоонкогенного типа вируса HPV16 L1, вызывающего цервикальный рак у женщин.

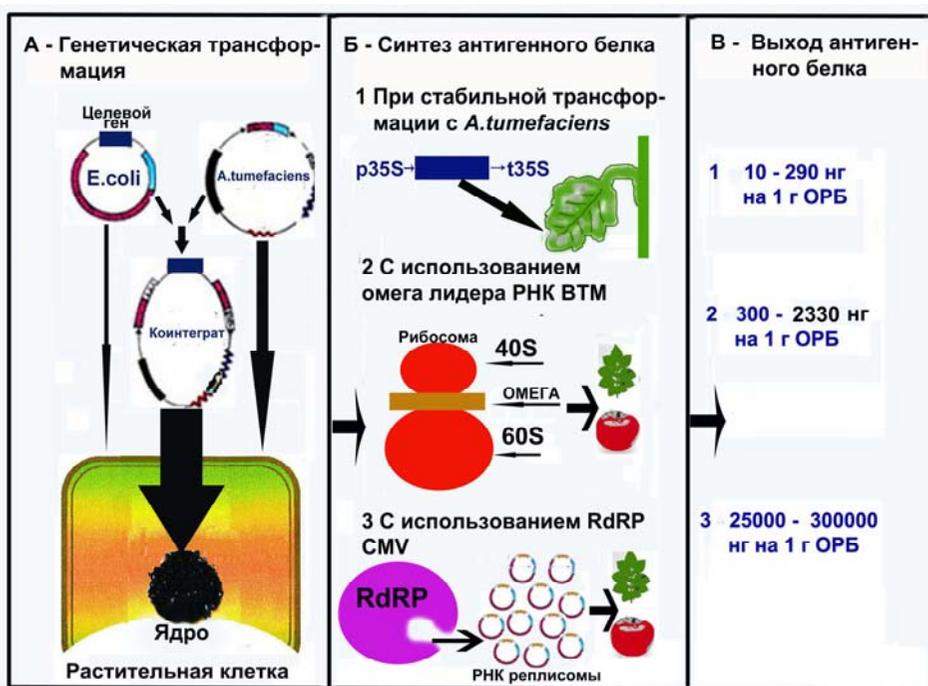


Рис. 5. Схема получения антигенного белка L1 оболочки папилломавируса высокоонкогенного типа 16 с использованием разных генноинженерных методов

Использование метода «биобаллистики» при создании вакцин. В 1989 г. Дж. Сэнфорд предложил идею создания метода быстрой и эффективной трансформации растений с помощью метода биобаллистики, при которой ДНК целевых генов или рекомбинантные плазмиды помещали на вольфрамовые или золотые «микропули», которые размещали на поверхности тефлоновых «макропуль» и выстреливали в растительные объекты с помощью генной пушки. Этот метод получил значительное развитие, так как такой способ трансформации оказался применимым не только для растений, но и других объектов, в том числе позвоночных, и даже их органов [12]. Метод получил название «биолистик», *biolistic* (сокр. от «биобалластика»). Впоследствии этот метод и генные пушки, работающие на основе инертных газов (гелия, аргона) заняли на какое-то время главенствующее положение в биотехнологии трансгенных растений, поскольку метод позволял «застреливать» большое количество рекомбинантных плазмид с высокоэкспрессирующими конструкциями. Выход синтезируемых антигенных белков увеличился в 10–100 раз. Г. Дэниелл и его сотрудники значительно усовершенствовали метод [20]: были получены трансгенные гомопластомные растения с высоким выходом не только антигенных, но и других гетерологичных белков, полезных для человека. Наибольший выход был получен при создании цистронной сопряжённости целевого гена, маркерного гена и фланкирующих их рекомбинирующих фрагментов генов пластид хозяйских растений. Подход подстраивания целевого гена под цистрон генома пластид позволил увеличить выход целевого белка кристаллического токсина 2a *B. thuringiensis* и составил до 46 % от ОРБ и более в листьях табака [20].

Экспрессия в пластидных конструкциях превышает в 1 000 или более раз экспрессию при ядерной трансформации. Следует упомянуть, что пластидная трансформация с использованием генов устойчивости к канамицину NPTII приводит к содержанию селективного фермента до 23 % от ОРБ. Однако такие вакцинные препараты представляют сомнительную ценность из-за очень высокого содержания ферментов устойчивости к антибиотику [16].

Комбинированные системы трансформации пластид разработал Р. Малига, который впервые совместил агробактериальную трансформацию для помещения экспрессирующей конструкции в ядро, а целевые гены помещал под лидер/терминатор малой субъединицы RUBISCO, транспортирующий целевой ген/белок в пластиды. При использовании гена, кодирующего токсин столбняка TetC, помещённого под пластидный промотор Prrgt1 и с регуляторными последовательностями генома энтеропатогенного фага T7G10a, фрагментов пластид *atrB/TrbcL* удалось повысить экспрессию до 10–25 % от ОРБ [16].

В 2015–2016 гг. нами была сделана попытка биобаллистической трансформации каллусов томата с целью изучения возможности применения этого метода для получения растений с более высокой продукцией антигенных белков. Для получения каллусов выделяли зародыши, которые культивировали на среде Мурасиге и Скуга с добавлением индолилуксусной кислоты и кинетина в соответствующих концентрациях в течение 3 недель на свету.

Генетическую трансформацию проводили в стерильных условиях с помощью пневматической генной пушки конструкции Р. К. Сяяева [1].

На рис. 6 видны результаты обстрела препаратом плазмиды рВ1121, несущей репортерный ген GUS, кодирующий синтез β -глюкуронидазы. Через 10 дней обстрелянные каллусы погружали в раствор субстрата 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронида и наблюдали развитие сине-голубой окраски. В контрольных каллусах подобной окраски не наблюдали.

Результаты показали перспективность данного метода для дальнейшей работы уже с целевыми генами, имеющими пластидное адресование. Биобаллистическая трансформация позволяет значительно (до величины порядка 2 мкг на 1 мг ОРБ) повысить выход антигенного белка (рис. 7).

Тем не менее пластидная трансформация всё ещё остаётся трудоёмким процессом, требующим к тому же сложной аппаратуры и значительных финансовых вложений.

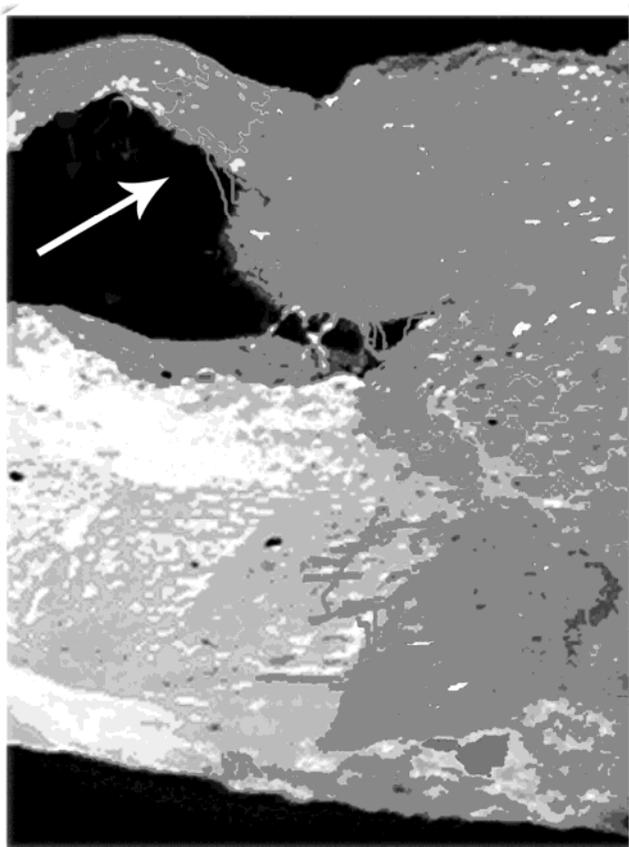


Рис. 6. Каллус томата через 10 дней после обстрела плазмидой рВ1121 GUS. Стрелкой указан окрашенный в голубой цвет проросток, образовавшийся из генетически трансформированного каллуса. Увеличение $\times 50$

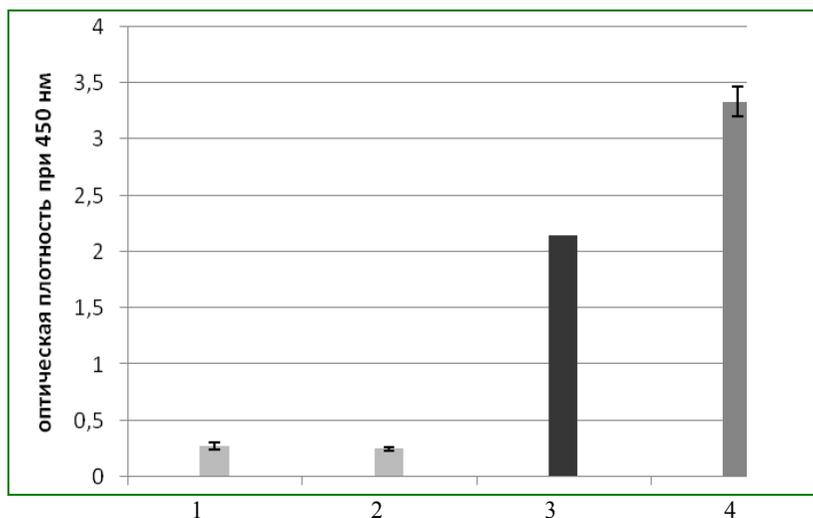


Рис. 7. Данные иммуноферментного анализа экстрактов, полученных из листьев контрольных и трансформированных растений томата. 1 – растения, трансформированные «микропулями» без целевой ДНК; 2 – растения, не подвергавшиеся биобаллистическому воздействию; 3 – стандартный белок HPV16 L1 в количестве 400 нг; 4 – листья растений, трансформированных «микропулями» с целевой ДНК ($n = 17$)

Как явствует из вышеизложенного, растительные экспрессионные системы находят широкое применение в биофарминге. В частности, вакцины, созданные на основе растений, имеют целый ряд предпочтительных качеств. Во-первых, это вакцины неинъекционные, изготовленные из съедобных плодов растений, широко употребляемых в пищу. Токсичность их практически сводится к нулю из-за отсутствия скрытых патогенов, прионов, транспозонов, патогенных вирусов растений, потенциально представляющих опасность для человека, а также других патогенов микробного происхождения. Они обладают более подходящим для млекопитающих фолдингом, гликозилированием и другими процессами посттрансляционного модифицирования синтезируемых белков.

При создании вакцин часто применяют различные адъюванты – соединения, способствующие усилению иммунного ответа организма. В качестве адъювантов чаще всего применяются соединения алюминия, которые одновременно являются сорбентами для вирусоподобных частиц вакцинного материала, продуцируемого дрожжевыми системами или экспрессионными системами на основе бакуловирусов. Известно также, что некоторые соли алюминия бывают токсичны [19]. Используют в качестве адъювантов также холерный токсин СТВ или термолабильный токсин ЛТВ энтеропатогенной *E. coli*. Эти токсины могут оказывать неблагоприятное воздействие на слизистую оболочку кишечника при пероральном применении [19].

При создании растительных вакцин можно использовать плоды таких растений, которые содержат природные адъюванты. В частности, в проектах исследовательской группы авторов настоящего обзора использовались плоды томата, которые в своём составе уже имеют природные адъюванты (томатин, ликопин, эскулетин, ликоперсицины, томатидины, соланины и др.) [13]. Это позволило избежать внесения в вакцинный материал искусственных адъювантов.

Будучи вакцинами перорального применения (в капсулах), растительные вакцины по сравнению с инъекционными не требуют при вакцинации специально обученного медицинского персонала. Поэтому вакцинация более проста и комфортна, особенно для детей. Растительные экспрессионные системы, по мнению ряда авторов [11], представляются не только более безопасными, но и более дешёвыми, вполне применимыми для крупномасштабного производства.

Немаловажным качеством растительных вакцин является также то, что они не требуют соблюдения жёсткой «холодной» цепи при транспортировке и хранении. По нашим данным, хранение и транспортировка таких вакцин может осуществляться не при -70 или -30 °С, но и в условиях морозильного отделения обычного холодильника при -20 °С. Антигенная активность вакцины сохраняется даже при комнатной температуре в течение года и более и только содержание в течение 30 сут. при $40...45$ °С уменьшает количество антигенного белка на треть.

Помимо профилактических в настоящее время возрос интерес к созданию терапевтических вакцин, которые могли бы быть применены в случаях, когда патологические процессы в организме уже выявлены [6]. Применительно к цервикальному раку при исследованиях в этом направлении, судя по литературным данным, чаще всего применяют вместо «поздних» генов (белок L1 на рис. 8) так называемые «ранние» гены группы E2, E6 и E7 (см. рис. 8).

Недавно установлено, что белок E2 осуществляет блокировку транскрипции на сайте раннего сигнала полиаденилирования. Это приводит к торможению прохождения полимеразы через сайт pAе и подавлению транскрипции «ранних» генов E6 и E7.

Белки E6 и E7 считаются причастными к онкогенезу, так как E6 инактивирует белок p53, являющийся супрессором онкогенеза в клеточном цикле, а белок E7 инактивирует взаимодействие с регуляторным белком pRB, связанным с переходом к необратимому росту клеточной популяции. Кроме того, все три белка имеют и другие функции и вовлечены в различные этапы метаболизма, так как взаимодействуют со многими факторами транскрипции, факторами крови и комплемента и активными клеточными белками с различными функциями, начиная от интерлейкинов и заканчивая рецепторами на мембранах [8]. Таким образом, взаимодействие белка E2 с белками E6 и E7 приводит к ослаблению необратимого интенсивного деления клеток в опухолевой ткани.

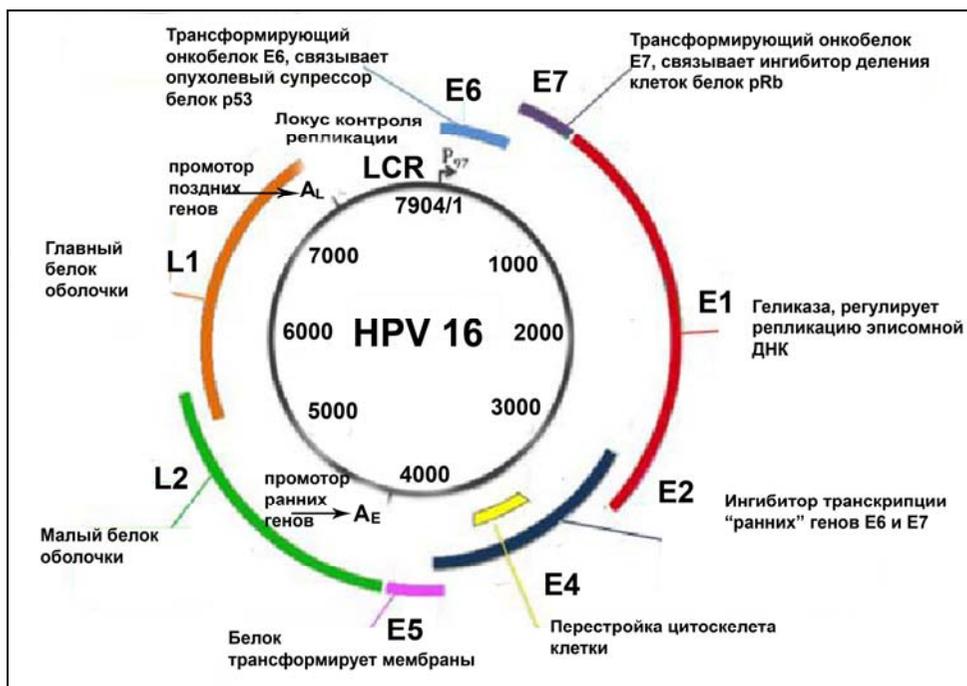


Рис. 8. Физическая карта папилломавируса человека. Показаны функции белков, кодируемых генами HPV: E – «ранние» (early) гены, L – «поздние» (late) гены

При исследовании терапевтического действия «ранних» генов наиболее вероятным считается их участие в процессе праймирования и активации Т-лимфоцитов. В результате CD8⁺ Т-лимфоциты (киллеры) и CD4⁺ Т-лимфоциты (хелперы) опознают раковые клетки и разрушают их путём апоптоза [13; 22].

Имеются первые попытки создания терапевтических вакцин на основе белков E2, E6 и E7. Например, нерастительная терапевтическая вакцина на основе BPVE2 была недавно испытана в Мексике и продемонстрировала почти 100%-ный результат выздоровления женщин при цервикальной неоплазии. Эта же вакцина дала положительные результаты в случае аногенитальных патологических образований у мужчин [21].

Получены обнадеживающие результаты испытаний терапевтических вакцин и растительного происхождения. Эти испытания на добровольцах были проведены в 2009 г. в США во время пандемии гриппа А H1N1. Рекомбинантный антигенный белок гемагглютинин НАС-1 вируса гриппа А H1N1 был получен в экспрессионной системе растений табака с использованием репликазы RdRP ВТМ [25]. В испытании был применён инъекционный метод. Добровольцам вводили в дельтовидную мышцу по 0,5 мл препарата НАС-1 очищенного экстракта из листьев табака. При анализе сыворотки крови и лимфоцитов обнаружили соответствующие антитела и увеличенный уровень интерлейкина IL-2 и интерферона. В результате наблюдалась положительная динамика в течение заболевания и процесса выздоровления [25].

Подводя итог всему изложенному, можно сделать вывод о том, что инновационные биотехнологии, широко использующие методы молекулярной биологии и геной инженерии, открыли новые возможности в создании перспективных типов растительных профилактических и терапевтических вакцин, работа над которыми интенсивно ведётся во многих странах.

Список литературы

1. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика : учеб. пособие / И. Ф. Жимулев. – Новосибирск : Изд-во Сиб. ун-та, 2003. – 479 с.
2. Изучение длительности мукозального иммунного ответа у мышей после приема кандидатной съедобной вакцины на основе плодов томата, трансгенного по гену TBI-HBS / Р. К. Саляев [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2009. – Т. 428, № 1. – С. 118–120.
3. Лидерные последовательности эукариотических мРНК могут быть связанными одновременно с иницирующей 80S рибосомой и 40S рибосомной субъединицей / С. А. Согорин [и др.] // Биохимия. – 2012. – Т. 77, вып. 4. – С. 437–441.
4. Мукозальная кандидатная вакцина против гепатита В, созданная на основе плодов томата, трансгенного по гену *preS2-S* / Р. К. Саляев [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2012. – Т. 446, № 5. – С. 583–586.
5. О сохранении в поколениях способности к синтезу антигенов ВИЧ-1 и гепатита В у растений томата, трансгенных по гену TBI-HBS / Р. К. Саляев [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2009. – Т. 425, № 6. – С. 833–836.
6. An E7-based therapeutic vaccine protects mice against HPV16 associated cancer / A. Venuti [et al.] // Vaccine. – 2009. – Vol. 27, N 25–26. – P. 3395–3397.
7. Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine / S. Massa [et al.] // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, N 16. – P. 3018–3021.
8. D'Abramo C. H., Archambault J. Small molecular inhibitors of human papillomavirus protein-protein interaction / C. H. D'Abramo, J. Archambault // The Open Virol. J. – 2011. – Vol. 5, N 1. – P. 80–95.
9. Fischer R. Molecular farming pharmaceutical proteins / R. Fischer, N. Emans // Transgenic Research. – 2000. – Vol. 9, N 4–5. – P. 279–299.
10. Gallie D. R. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F / D. R. Gallie // NAR. – 2002. – Vol. 30, N 15. – P. 3401–3411.
11. Hefferon K. Plant virus expression vectors: a powerhouse for global health [Electronic resource] / K. Hefferon // Biomedicines. – 2017. – Vol. 5, N 3, 44; doi: 10.3390/biomedicines5030044.
12. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells / T. M. Klein [et al.] // Nature. – 1989. – Vol. 327, N 6117. – P. 70–73.
13. Identification and mode of inheritance of quantitative trait loci for secondary metabolite abundance in tomato / S. Alseekh [et al.] // The Plant Cell. – 2015. – Vol. 27, N 3. – P. 485–512.
14. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses / S. N. Shchelkunov [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2006. – Vol. 23, N 13. – P. 959–67.
15. Lindbo J. A. High-efficiency protein-expression in plants from agroinfection-compatible tobacco mosaic virus expression vectors / J. A. Lindbo // BMC Biotechnology. – 2007. – Vol. 7, N 52. – P. 1–11.

16. Maliga P. Progress towards commercialization of plastid transformation technology / P. Maliga // *Trends in Biotechnology*. – 2003. – N 1. – P. 20–28.
17. Mason H. S. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants / H. S. Mason, D. H. Lam, C. J. Arntzen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – Vol. 89, N 24. – P. 11745–11749.
18. Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens encapsulated in plant cells / K.-Ch. Kwon [et al.] // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2013. – Vol. 65, N 6. – P. 782–799.
19. Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs / N. Petrovsky // *Drug. Saf.* – 2015. – Vol. 38, N 11. – P. 1059–1074.
20. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals / H. Daniell [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2009. – Vol. 14, N 12. – P. 669–672.
21. Regression of human papillomavirus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine / R. Rosales [et al.] // *Human Gene Therapy*. – 2014. – Vol. 25, N 12. – P. 1035–1049.
22. Rosales R. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers / R. Rosales, C. Rosales // *World J. of Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 5, N 5. – P. 1002–1017.
23. Streatfield S. J. Plant based vaccines / S. J. Streatfield, J. A. Howard // *Intern. J. for Parasitology*. – 2003. – Vol. 33, N 5–6. – P. 479–493.
24. Takeyama H. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials / H. Takeyama, H. Kiyono, Y. Yuki // *Therapeutic Advances in Vaccines*. – 2015. – Vol. 3, N 5–6. – P. 139–154.
25. The human potential of a recombinant pandemic influenza vaccine produced in tobacco plants / A. Jul-Larsen [et al.] // *Human Vaccin. Immunother.* – 2013. – Vol. 8, N 5. – P. 653–661.
26. Wiczarek P. Suppress to survive-implication of plant viruses in PTGS / *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2015. – Vol. 33, N 3. – P. 335–345.

Plant Expression Systems for the Creation of Peroral Vaccines against Dangerous Infective Diseases

R. K. Salyaev¹, N. I. Rekoslavskaya¹, A. S. Stolbikov^{1,2},
A. V. Tretyakova^{1,2}, S. N. Osipenko¹

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

² *Irkutsk State University, Irkutsk*

Abstract. The development of plant peroral vaccines was possible at the creation of plant expression systems that have a row advantages in comparison to other ones such as inexpensive obtaining of plant-made vaccines, easier transfer to the possibility of commersion and scalability, safety due to the absence of mammalian pathogens, prions, transposons, dangerous viruses at the latent stage and others. There were considered pathways of the creation of preventive and therapeutics vaccines on the base of transgenic plants against dangerous virus diseases: HIV, hepatitis B, oncogenic papillomaviruses and another diseases. At the base of the creation of preventive vaccines, the formation of highly specific neutralizing antibody immune response is assumed that has very broad capture of virus epitops. The main principle of the development of therapeutics vaccines is established on the activation of T lymphocytes harboring domens CD8+ («killers») and CD4+ («helpers») resulted in the recognition of cancer cells and their apoptosis. During the activation

of noncharged («naive») T lymphocytes, the dendritic cells from mucosal organ tissues and proteins of МНС (main histocompatibility complex) participate of both equal extent. A special attention was payed to methods of designs of genetic constructs provided the high expression of target genes and the synthesis of antigenic proteins. The methods of plant transformation that are commercially most valuable, are developed in order to have the short time of the synthesis and the large amount of antigenic proteins without very expensive multisteps of isolation and purifying. The diverse abundance of plant viruses regulatory elements and different RNA virus replicases are evolved in the design of genetic constructs that allow the longest use of template RNA for more effective translation and higher yield of target antigenic proteins. For example, the replicase, RNA-dependent RNA polymerase, antisilencers, «shunts» and «gaps» for ribosomes, leader sequences are used for these purposes.

Keywords: plant expression systems, peroral vaccines on the base of transgenic plants, induction of immune response, preventive and therapeutic vaccines.

Салаяев Рюрик Константинович
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН, советник РАН
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Salyaev Ryurik Konstantinovich
Corresponding Member for RAS, Advisor
for RAS, Doctor of Science (Biology)
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Рекославская Наталья Игоревна
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Rekoslavskaya Nataliya Igorevna
Doctor of Science (Biology),
Principal Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Столбиков Алексей Сергеевич
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24–18–70
e-mail: valkir5@yandex.ru

Stolbikov Aleksey Sergeevich
Candidate of Science (Biology),
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–18–70
e-mail: valkir5@yandex.ru

Третьякова Анастасия Валерьевна
кандидат биологических наук,
научный сотрудник

Tretyakova Anastasiya Valeryevna
Candidate of Science (Biology),
Research Scientist

*Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59
факс: (3952) 51-07-54*

доцент

*Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Маркса, 1
тел. (3952) 24-18-70
e-mail: anastasiya_chepi@mail.ru*

*Осипенко Семен Николаевич
инженер*

*Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел. (факс) (3952) 51-07-54
e-mail: sifibr@yandex.ru*

*Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS*

*132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-46-59
fax: (3952) 51-07-54*

Associate Professor

*Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: anastasiya_chepi@mail.ru*

*Osipenko Semen Nikolaevich
Engineer*

*Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel.(fax): (3952) 51-07-54
e-mail: sifibr@yandex.ru*