

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Марданова Евгения Сергеевна**

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В  
РАСТЕНИЯХ НА ОСНОВЕ САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ ВИРУСНЫХ  
ВЕКТОРОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНОВ  
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Специальность 1.5.3. – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

МОСКВА – 2024 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	2
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
2. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ.....	68
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	69
4. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	90
4.1. Создание экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля. ....	90
4.2. Разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида, присоединенного к ядерному антигену вируса гепатита В. ....	108
4.3. Разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида, присоединенного к бактериальному флагеллину. ....	118
4.4. Разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида и фрагмента гемагглютинина, присоединенных к бактериальному флагеллину. ....	135
4.5. Экспрессия в растениях капсидного белка вируса гепатита Е и его применение в качестве носителя M2e пептида вируса гриппа А и рецептор- связывающего домена белка S коронавируса SARS-CoV-2.....	143
4.6. Экспрессия в растениях антигенов коронавируса SARS-Cov-2. ....	169
5. ОБСУЖДЕНИЕ .....	184
ВЫВОДЫ .....	196
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	198
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	203

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы*

Успехи в области генетической инженерии растений, исследования фундаментальных механизмов экспрессии растительных генов, открыли новые возможности в использовании растений в качестве «биофабрик» для получения рекомбинантных белков, в том числе белков медицинского назначения, таких как антитела, вакцины и т.п. Получение рекомбинантных белков в растениях имеет существенные преимущества по сравнению с используемыми в настоящее время для этих целей системами экспрессии на основе клеток животных, дрожжей или бактерий. Культивирование растений не требует больших затрат за счет чего стоимость целевых белков, выделяемых из растений, оказывается существенно ниже стоимости аналогичных продуктов, полученных в других экспрессионных системах. Можно создать условия, при которых целевые белки будут накапливаться в определенных компартментах растения (эндоплазматический ретикулум, хлоропласты или клеточные стенки) и/или храниться долгое время в семенах, клубнях или корнеплодах. Кроме того, использование растений вместо микроорганизмов или клеток животных исключает риск передачи человеку патогенов или токсинов. Использование трансгенных растений в качестве «биофабрик» сдерживается в настоящее время низкой эффективностью таких систем экспрессии. Причинами этого могут являться, в числе прочих факторов, низкая эффективность трансляции мРНК чужеродных генов и проявление явления посттранскрипционного у молчания генов.

Альтернативой трансгенным растениям является транзientная экспрессия генов. При транзientной экспрессии ДНК обычно не включается в ядерный геном. Данный вид экспрессии временный, однако, в одной клетке может присутствовать большое количество копий мРНК гена интереса, что обеспечивает высокий уровень синтеза конечного продукта. Данный способ связан с использованием природных свойств почвенной агробактерии

*Agrobacterium tumefaciens*. Данная бактерия способна переносить определенный участок своей ДНК (Т-ДНК) в растительную клетку. Самым популярным растением, применяемым для транзientной экспрессии во всем мире, является табак *Nicotiana benthamiana*. Свою популярность это растение приобрело благодаря возможности введения в ее клетки агробактерий с высокой эффективностью, быстрому росту, большим листьям, в которых происходит синтез рекомбинантных белков, простоте манипуляций.

Получение рекомбинантных белков в растениях не требует большого времени. Так компания Medicago анонсировала, что получила первые дозы препаратов кандидатной вакцины от COVID-19 спустя лишь 20 дней после получения копии РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Для получения рекомбинантных белков в растениях требуются эффективные экспрессионные векторы. Высокий уровень экспрессии чужеродных генов в растениях может быть достигнут за счет использования векторов на основе вирусов растений. В данной работе был использован геном X вируса картофеля. На его основе была создана серия векторов для экспрессии рекомбинантных белков в растениях *N. benthamiana*. Разработанные векторы были применены для экспрессии в растениях кандидатных вакцин от социально-значимых инфекций, - гриппа А, гепатита Е и коронавируса SARS-CoV-2.

#### *Научная новизна работы*

Разработаны новые высокоэффективные самореплицирующиеся экспрессионные векторы на основе генома X вируса картофеля для получения рекомбинантных белков в *N. benthamiana*. Уровень экспрессии целевых белков повышен за счет оптимизации трансляции мРНК и подавления посттранскрипционного сайленсинга генов.

Разработаны новые «растительные» кандидатные противогриппозные вакцины на основе консервативных антигенов вируса гриппа А, - М2е пептида и участка второй субъединицы гемагглютинина. Для повышения

иммуногенности эти антигены были присоединены к высокимуногенным белкам-носителям, - ядерному антигену вируса гепатита В, флагеллину бактерии *Salmonella typhimurium*, капсидному белку вируса гепатита Е.

Экспрессирован в растениях рекомбинантный белок на основе рецептор-связывающего домена S белка коронавируса SARS-Cov-2, присоединенного к бактериальному флагеллину. Этот белок может стать основой для создания «растительной» вакцины от COVID-19. Также в растениях экспрессированы белки, включающие фрагмент рецептор-связывающего домена SARS-Cov-2 и M2e пептид вируса гриппа А, которые могут быть использованы для разработки рекомбинантной бивалентной вакцины.

#### *Практическая ценность работы*

Практическая значимость работы обусловлена возможностью использования разработанных экспрессионных векторов для продукции различных рекомбинантных белков в растениях.

В ходе работы были разработаны кандидатные вакцины, которые могут быть использованы в дальнейшем для создания соответствующих вакцинных препаратов. В их число входили 3 кандидатные вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида вируса гриппа, присоединенного к белкам-носителям, - ядерному антигену вируса гепатита В и бактериальному флагеллину, а также на основе M2e пептида и консервативного фрагмента гемагглютинаина, присоединенных к флагеллину. Полученные в растениях-продуцентах рекомбинантные белки в ходе испытаний на лабораторных животных показали высокую иммуногенность и протективное действие.

Экспрессирован в растениях капсидный белок вируса гепатита Е, который может быть основой кандидатной вакциной против вируса гепатита Е, а также может быть использован для разработки диагностических систем.

Разработанная система экспрессии рекомбинантного белка на основе рецептор-связывающего домена S белка SARS-Cov-2, присоединенного к

флагеллину, может быть использована для дальнейшей разработки вакцины от COVID-19.

*Апробация работы.* Результаты работы были представлены на следующих международных и российских конференциях:

Результаты работы были представлены в виде докладов на научных конференциях: “International Conference on Plants Systems Biology and Biotechnology” 2021 г. (Золотые пески, Болгария), “European Biotechnology Congress” 2020 г. (Прага, Чехия), конференция “Neuroscience, Bioinformatics, Microbiome and Beyond conference” 2019 г. (Бачинова, Болгария), “Plant Based Vaccines Antibodies & Biologics conference” 2019 г. (Рига, Латвия), “International Conference on Natural Products Utilization” 2019 г. (Албена, Болгария), V съезд биохимиков России 2016г. (Дагомыс, Россия), научно-практическая конференция “Грипп: эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение” 2012 г. (С-Петербург, Россия), 12-ая международная Пущинская школа-конференция молодых ученых 2008г. (Пущино, Россия).

#### *Публикации по теме диссертации*

По теме диссертации опубликована 21 работа, в том числе 19 статей в рецензируемых научных журналах, получено 2 патента РФ на изобретения.

#### *Объем и структура диссертации*


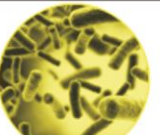





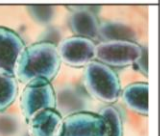
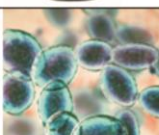
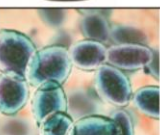
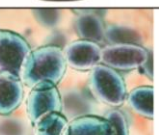





Материалы диссертации изложены на 240 страницах машинописного текста и включают 109 рисунков и 12 таблиц. Диссертация состоит из разделов: “Оглавление”; “Определения, обозначения и сокращения”; “Введение”; “Цель и задачи работы”; “Обзор литературы”; “Материалы и методы”; “Результаты”; “Обсуждение полученных результатов”; “Выводы”; “Список публикаций по теме диссертации”; “Список цитируемой литературы”, список которой содержит 6 отечественных и 313 иностранных источников.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Растения—биофабрики.

Для продукции рекомбинантных белков медицинского и ветеринарного назначения могут быть использованы различные системы экспрессии, – бактерии, дрожжи, растения, клетки насекомых или животных. Среди этих систем растительная «биофабрика» по получению рекомбинантных белков имеет целый ряд преимуществ, среди которых простота манипуляций, высокая скорость и низкая стоимость выращивания растений, удобство масштабирования, наличие у растений посттрансляционных модификаций, свойственных высшим эукариотам, а также отсутствие у животных и растений общих патогенов, что делает препараты, полученные в растениях, безопасными [Fischer *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2012]. В таблице 1.1.1 представлены сравнительные характеристики различных экспрессионных систем.

Таблица 1.1.1. Сравнительные характеристики систем продукции рекомбинантных белков (от самых привлекательных “+” до наименее привлекательных “-”)

итоговая стоимость	время	качество	риск загрязнения
 E.coli		 животные	 растения
			 дрожжи
			
			

Идеальной системы экспрессии не существует. У каждой системы есть свои плюсы и свои минусы. В настоящее время распространенной в России является бактериальная система экспрессии, а самой популярная – на основе *E.coli*.

Использование растений в биотехнологии происходит в нескольких направлениях (рис. 1.1.1).



Рисунок 1.1.1. Возможности использования растений в биотехнологических целях.

Первое направление включает в себя создание растений с определенными свойствами. Так ведется разработка сортов, устойчивых к насекомым-вредителям, болезнями, вызванными вирусами, плесневыми грибами и бактериями. Параллельно проводятся исследования, которые позволят вывести сорта сельскохозяйственных культур, устойчивых к неблагоприятным погодным и климатическим условиям, например, к засухе, засоленной почве, нехватке воды. Также создаются растения, в которых увеличена доля полезных и питательных веществ, снижено содержание



насыщенных жиров и аллергенов. Также в эту группу можно внести трансгенные растения, которые используются в качестве модельных объектов для изучения фундаментальных проблем. Многие трансгенные растения сейчас находятся в массовом производстве. Это трансгенная соя, кукуруза, картофель, трансгенные маслянистые растения, такие как рапс и подсолнечник, и многие другие.

Другим направлением является создание «съедобных» вакцин. В данном случае получают генно-модифицированное растение, синтезирующее вакцинный белок. Концепцию получения вакцин в трансгенных растениях впервые сформулировали Х. Мэйсон с соавторами (1992 г.). Они предприняли попытку получения съедобной вакцины против вируса гепатита В на основе трансгенного табака. На следующем этапе был создан трансгенный картофель, продуцирующий поверхностный антиген вируса гепатита В, и при скормлении мышам клубней такого картофеля наблюдали развитие специфического иммунного ответа против вируса гепатита В. В 1999 г. были начаты эксперименты на добровольцах, и у людей, поедавших сырые клубни картофеля, также наблюдали специфичный противовирусный иммунный ответ. Также была получена съедобная вакцина против вируса гепатита В на основе люпина и салата. Были созданы трансгенные растения картофеля и табака, экспрессирующие белок нуклеокапсида вируса Норфолка, вызывающего у людей острый гастроэнтерит. Позже были сконструированы трансгенные растения картофеля, синтезирующие олигомерный полипептид LT-B, входящий в состав термолабильного токсина *E. coli*, вызывающего диарею. Несмотря на активные исследования в этой области, коммерческих препаратов на сегодняшний день нет.

Еще одно направление связано с наработкой в растениях определенных продуктов, которые затем выделяются из растений и могут быть использованы, например, в качестве лекарственных препаратов.

Первым зарегистрированным примером биофармацевтического препарата в растениях было производство химерного гормона роста человека с помощью трансгенного табака и подсолнечника [Barta *et al.*, 1986]. Первый генно-инженерный препарат растительного происхождения, одобренный FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США), был произведен компанией Protalix в 2012 году. Биотерапевтическая компания Protalix из Израиля использует систему суспензии трансгенных клеток моркови для получения альфа-галиглюцеразы для лечения болезни Гоше [Zimran *et al.*, 2011]. Биотехнологическими компаниями по всему миру уже создано большое количество трансгенных растений для получения белков, в том числе и медицинского назначения [Paul *et al.*, 2011; Sourrouille *et al.*, 2009; Rubiski *et al.*, 2008; Yusibov *et al.*, 2008; Hood *et al.*, 2002]. Среди компаний, деятельность которых основана на использовании трансгенных растений, следует отметить фирмы «Protalix» (Израиль), «Medicago» (Канада), «LemnaGene» (Франция), «Planet Biotechnology» (США), «ProgyGene» (Люксембург), «Chlorogen Inc.» (США), «SemBioSys Genetics» (Канада) и «Bayer AG» (Германия). Среди белков можно встретить такие препараты, как инсулин, лизоцим, лактоферрин, коллаген, липазу, антитела, вакцины и др. Многие из данных препаратов уже проходят клинические испытания.

Существенным недостатком трансгенных растений для наработки определенных продуктов является низкий уровень синтеза рекомбинантных белков (как правило, менее 1% от общего белка) и длительный процесс получения самого трансгенного растения.

Другим способом наработки рекомбинантных белков в растениях является так называемая транзиентная экспрессия. При транзиентной экспрессии ДНК обычно не включается в ядерный геном и не реплицируется. Данный вид экспрессии временный, однако, в одной клетке может присутствовать большое количество копий чужеродной ДНК, что обеспечивает высокий уровень конечного продукта. При транзиентной

экспрессии растительные клетки используются как «биофабрики» для наработки целевого белка, при этом получение трансгенного растения не требуется. Поэтому при продукции белков в растениях данный вариант является более предпочтительным.

Получение рекомбинантных белков в растениях включает в себя несколько этапов. Первый этап включает поиск и выделение (или синтез) генов, используемых для переноса в растительную клетку. Гены, представляющие интерес (или целевые гены), могут быть получены путем синтеза *in vitro*, или амплифицированы из ДНК организма, содержащий этот ген.

На втором этапе целевая ДНК переносится в клетку. Для переноса ДНК в растительную клетку используется способ, который связан с использованием природных свойств почвенной агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Данная агробактерия способна переносить определенный участок ДНК в растительную клетку. В природной *A. tumefaciens* помимо хромосомы содержится Ti-плазмида. Эта плазмида содержит Т-ДНК (transferred DNA), которая составляет 12-22 тыс. пар оснований и встраивается в ДНК растительной хромосомы. Она кодирует ферменты синтеза фитогормонов и опинов – производных аминокислот, которые используются бактерией как источник углерода, азота и энергии. Т-ДНК Ti-плазмид обладает двумя свойствами, делающими ее по существу идеальным вектором для введения чужеродных генов в клетки растений. Во-первых, круг хозяев агробактерий очень широк: они трансформируют клетки многих двудольных растений. Известно, что можно добиться заражения и однодольных, в том числе злаков. Во-вторых, интегрированная в состав генома растения Т-ДНК наследуется как простой доминантный признак в соответствии с законами Менделя (что важно при получении трансгенных растений с помощью агробактерий). Простейший способ введения Т-ДНК в клетки растения состоит в том, чтобы заразить его *A. tumefaciens*, содержащей подходящую Ti-плазмиду. После проникновения агробактерий в

межклеточное пространство Т-ДНК переносится из агробактерии в растительную клетку, сама бактерия в клетку не проникает, а остается в межклеточном пространстве.

При применении транзientной экспрессии генов в растениях для переноса рекомбинантной ДНК с помощью агробактерий разрабатываются специальные векторы. Эти, так называемые, бинарные векторы состоят из двух частей: первый компонент – Т-ДНК (сегмент, разделенный пограничными последовательностями, правой [RB] и левой [LB] границей) и может содержать несколько сайтов клонирования, генный маркер для трансформированных растительных клеток, репортерный ген, а второй компонент осуществляет функции репликации плазмиды в *E. coli* и *A. tumefaciens*, содержит гены-маркеры для бактерий [Komori *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008]. Так кассету экспрессии, которую необходимо перенести в растительную клетку клонируют в Т-ДНК область вектора. В качестве кассеты экспрессии может быть как нереплицирующаяся последовательность (например, промотор – ген интереса – терминатор), так и вирусные геномы, которые позволяют воспроизводиться вирусу в растении и системно распространяться по нему. Обычно для создания таких векторов используют вирус табачной мозаики или X вирус картофеля, геномы которых имеют небольшие размеры и содержат плюс цепь РНК, однако и другие вирусы являются основой векторов [LeBlanc *et al.*, 2021].

Введение векторов в клетки растений осуществляется с помощью инфильтрации листьев суспензией *Agrobacterium tumefaciens*, содержащих бинарный вектор, в область Т-ДНК которого включен целевой ген под контролем генетических элементов растительного вируса.

Для транзientной экспрессии используют такие растения, как *Lactuca sativa*, *Arabidopsis thaliana* или *Nicotiana tabacum*. В последнее время *N. benthamiana* стала наиболее широко используемым экспериментальным хозяином при производстве рекомбинантных белков в растениях [Goodin *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2021]. Преимуществами этого растения являются

легкость трансформации, быстрый рост, большое количество биомассы, производит достаточно семян для масштабного производства. На данный момент это растение используется в качестве основного такими компаниями, как Medicago, Kentucky BioProcessing, PlantForm, Icon Genetics, iBio, CapeBio, Bioapp, Leaf Expression Systems и др.

К преимуществам транзientной экспрессии в растениях относятся простота манипуляций, быстрота всего цикла работ от гена до готового белка, и высокий выход конечного продукта. Также в данном случае возможен синтез белков, состоящих из нескольких субъединиц. Данный способ позволяет получать в течение нескольких дней белок в больших количествах (до нескольких грамм белка на килограмм массы растения). Продукт уже может детектироваться через 3 часа после проникновения агробактерий в клетку и переноса ДНК, а экспрессия сохраняется до 10 дней. Максимум экспрессии определяется для каждого белка индивидуально, обычно составляет 3-4 суток. Суммарно на получения белков в растениях уходит 2-3 недели. На рисунке 1.1.2 представлена принципиальная схема синтеза белков в растениях.

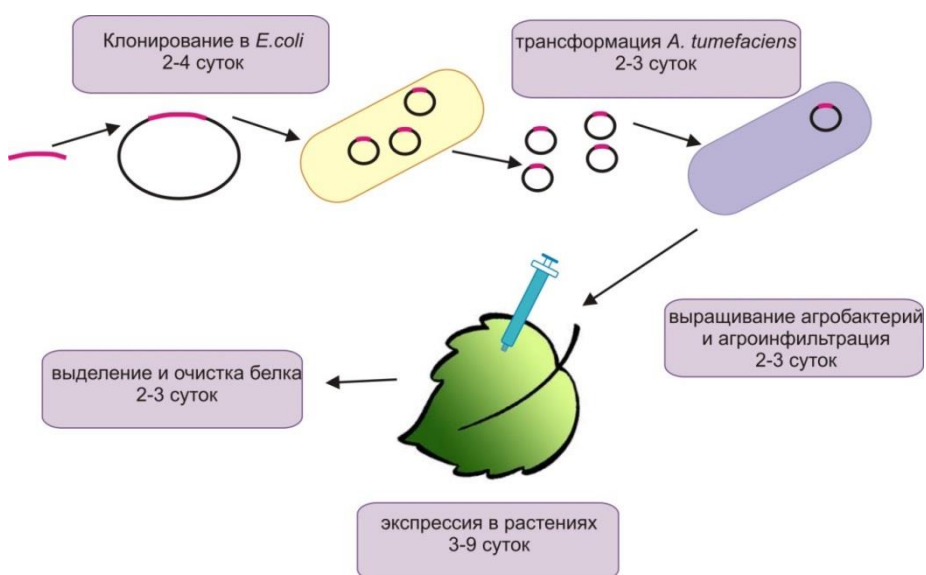


Рисунок 1.1.2. Принципиальная схема экспрессии генов целевых белков в растениях. Получение белка в растениях занимает 2-3 недели.

В растениях уже экспрессированы вакцины от таких заболеваний, как вирус папилломы человека, вирус гепатита В [Thuenemann *et al.*, 2013], вирус гриппа, вирус папилломы крупного рогатого скота [Love *et al.*, 2012], вирус африканской катаральной лихорадки, вирус герпеса рогатого скота [Perez Filgueira *et al.*, 2003].], вирус ящура [Wigdorovitz *et al.*, 1999] и др. Растительная вакцина против пандемического гриппа H5N1 уже прошла все стадии клинических испытаний и находится на регистрации. Данная вакцина разработана компанией “Medicago” [Ward *et al.*, 2020].

Известно много работ по транзientной экспрессии в растениях кандидатных вакцин на основе вирусоподобных частиц (VLP). Благодаря своей структуре, сходной со структурой вируса, вирусоподобные частицы вызывают эффективный иммунный ответ и считаются привлекательными кандидатами для разработки кандидатных вакцин [Bachmann *et al.*, 2010; Mohsen *et al.*, 2017; Mohsen *et al.*, 2018].

### *Вирус гепатита В*

Первые вирусоподобные частицы, полученные в трансгенных растениях табака, состояли из поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg [Mason *et al.*, 1992]). Несмотря на низкий уровень накопления HBsAg в листьях трансгенных растений табака (0,01% растворимого белка листьев), было показано, что из белка собираются вирусоподобные частицы. Иммуногенность HBsAg была показана при введении препарата экспериментальным мышам [Thanavala *et al.*, 1995]. HBsAg синтезируется в различных съедобных растениях, включая люпин, картофель, банан, помидоры и салат, и, как правило, эффективен для индукции иммунного ответа против HBV при пероральном введении мышам и людям [Kapusta *et al.*, 1999; Kapusta *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2001; Thanavala *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2005; Pniewski *et al.*, 2011]. Однако с практической точки зрения следует отметить, что, по-видимому, разработка «растительной» вакцины на основе HBsAg не продвинулась после 1 этапа

клинических испытаний [Karusta *et al.*, 2001; Thanavala *et al.*, 2005]. Это указывает на нерешенные проблемы масштабирования производства по сравнению с широко применяемой экспрессией на основе дрожжей [Joung *et al.*, 2016; Но *et al.*, 2020], наряду с общими проблемами применения пероральные препаратов (воспроизводимость от партии к партии и сложность определения дозы антигена).

Помимо HBsAg, частицы ядерного антигена вируса гепатита В (HBcAg), были продуцированы в растениях, сначала в трансгенных, а впоследствии и с помощью транзientной экспрессии [Pniewski, 2013; Mechtcheriakova *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Tsuda *et al.*, 1998]. Хотя такие частицы потенциально могут лечь в основу вакцин против вируса гепатита В HBV [Pyrski *et al.*, 2019], они в основном использовались в качестве носителя чужеродных антигенов [Peuret *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2019].

### *Вирус гриппа*

Большое число работ по антигенам вируса гриппа, полученным в растительной системе экспрессии, было проведено после первых успехов с экспрессией HBsAg вируса гепатита В. Представление гемагглютиниона, или отдельных эпитопов вируса гриппа на поверхности частиц СРМV [Meshcheriakova *et al.*, 2009], HBcAg [Ravin *et al.*, 2012], TMV [Mallajosyula *et al.*, 2014], наноалмазных частиц [Pham *et al.*, 2017] вызывало сильный иммунный ответ у животных, но экспериментов на людях не проводилось.

В других работах гемагглютинин экспрессировали без белка-носителя, причем он образовывал наноразмерные частицы [Mett *et al.*, 2008; Shoji *et al.*, 2013; Phan *et al.*, 2013; Phan *et al.*, 2014; Phan *et al.*, 2017; Shoji *et al.*, 2008; Shoji *et al.*, 2009; Shoji *et al.*, 2011; Mortimer *et al.*, 2012; Neuhaus *et al.*, 2014]. Преимущественно гемагглютинин в растениях синтезируется с помощью транзientной экспрессии, но также была продемонстрирована возможность экспрессия иммуногенного гемагглютиниона в семенах табака [Ceballo *et al.*, 2017], как и экспрессия нуклеопротеина гриппа в семенах кукурузы

[Nahampun *et al.*, 2015]. Растительные препараты на основе гемагглютинина прошли I фазу клинических испытаний [Chichester *et al.*, 2012; Cummings *et al.*, 2014], однако дальнейшего развития данные исследования не получили.

Большая часть работ по разработке «растительных» вакцин от гриппа является лабораторными исследованиями, в то время как канадская компания Medicago способна производить кандидатные вакцины в практически-значимых масштабах. В основополагающей статье [D'Aoust *et al.*, 2008] описано получение VLP на основе гемагглютинина вируса гриппа H5N1 в *Nicotiana benthamiana*. В этой статье было продемонстрировано не только образование VLP, но и защитный иммунитет у лабораторных животных (мыши). В последствии были получены одновалентных кандидатные вакцины на основе VLP против пандемических штаммов, таких как H5N1 [Landry *et al.*, 2010; Pillet *et al.*, 2018] и H7N9 [Pillet *et al.*, 2015], затем последовал четырехвалентный препарат для сезонного гриппа, который успешно прошел фазу I [Pillet *et al.*, 2016], фазу II [Pillet *et al.*, 2019] и фазу III клинических испытаний [Ward *et al.*, 2020]. В целом, эти исследования демонстрируют хорошую переносимость, безопасность и иммуногенность растительной вакцины на основе гемагглютинина вируса гриппа. Получаемые в растениях VLP на основе гемагглютинина обеспечивают защиту от гриппа у взрослых всех возрастов, сопоставимую с коммерческими вакцинами против сезонного гриппа. Эта вакцина в настоящее время находится на рассмотрении органов здравоохранения в различных странах. Важно отметить, что, хотя Medicago, несомненно, является мировым лидером в производстве VLP в качестве вакцинных препаратов от вируса гриппа в растениях, однако и другие группы ведут исследования в данном направлении. Например, Rybicki (2014) продемонстрировал получение VLP на основе гемагглютинина вируса типа H5N1, а в 2020 г. Smith *et al.* экспрессировали в растениях гемагглютинин вируса гриппа H6N2 как основы ветеринарной вакцины для домашней птицы.



## Коронавирусы

Продолжающаяся пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, мобилизовала научное сообщество на создание вакцин от этого заболевания, и область экспрессии в растениях не стала исключением [Capell *et al.*, 2020; Dhama *et al.*, 2020; Rosales-Mendoza *et al.*, 2020]. Американская компания iBio объявила, что разрабатывает в растениях кандидатную субъединичную вакцину на основе фрагментов поверхностного гликопротеида SARS-CoV-2, присоединенных к белку-носителю LickM (термостабильный фермент лихеназа,  $\beta$ -1,3-1,4-глюканаза из *Clostridium thermocellum* [Mett *et al.*, 2008]) [Capell *et al.*, 2020].

Аналогичным образом, компания Kentucky BioProcessing также объявила о разработке в растениях кандидатной субъединичной вакцины, которая в настоящее время проходит I и II стадии клинических испытаний (NCT04473690). Никаких научных данных ни по одной из этих вакцин-кандидатов еще не опубликовано.

Компания Medicago использовала свой опыт получения растительных VLP от вируса гриппа при разработке вакцинного препарата от нового вируса, SARS-CoV-2. Данная кандидатная вакцина состоит из S белка SARS-CoV-2 с некоторыми модификациями: было введено несколько стабилизирующих точечных мутаций, использовался растительный сигнальный пептид вместо нативной последовательности, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост S белка были заменены эквивалентом последовательности из гриппа H5 NA [Ward *et al.*, 2021]. Данный препарат уже прошел три стадии клинических испытаний на людях и показал свою безопасность и эффективность.

До пандемии SARS-CoV-2 было предпринято несколько попыток получения вакцин-кандидатов против коронавирусов в растительной системе экспрессии. Li с соавт. [Li *et al.*, 2006] экспрессировали белок S1 (область эктодомена S, которая включает рецептор-связывающий домен) SARS-CoV в листьях табака с помощью транзientной экспрессии, а также в трансгенном

табаке и салате, хотя эксперименты по иммуногенности не проводились. Другие группы экспрессировали N [Zheng *et al.*, 2009] или M [Demurtas *et al.*, 2016] белки SARS-CoV в *N. benthamiana*, эксперименты по иммуногенности были проведены.

Также есть примеры работ с ветеринарными коронавирусами. Были получены трансгенные растения арабидопсиса [Gómez *et al.* 1998] и картофеля [Gómez *et al.* 2000], продуцирующие S белок вируса, заражающего свиней (TGEV, transmissible gastroenteritis coronavirus). Также и в других работах предпринимались попытки экспрессии белков коронавируса в ветеринарных целях [Huy *et al.*, 2009; Huy *et al.*, 2011; Huy *et al.*, 2012; Huy *et al.*, 2016; Tien *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2020; Egelkrout *et al.*, 2020]

Группа Джоржа Ломоносова (JIC, Norwich, UK) коэкспрессировала в растениях E, M и S белки коронавируса, и показала образование VLP, однако низкий уровень экспрессии и трудности с очисткой препаратов приводят к сложностям с количественной оценкой и дальнейшим характеристикам полученных частиц [Peuret *et al.*, 2021].

На рис. 1.1.3 представлено схематическое изображение структурных элементов описанных выше вирусов.

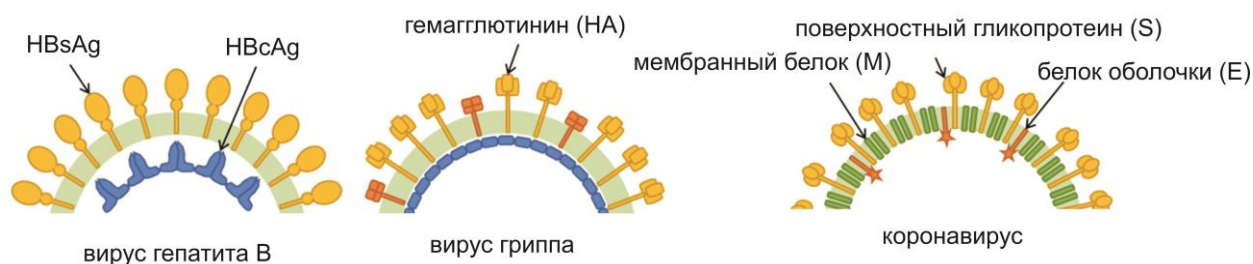


Рисунок 1.1.3. Диаграмма, иллюстрирующая использованные в «растительных» вакцинах основные структурные элементы вирусов гепатита В, вируса гриппа А, и коронавируса.

В нашей работе растения *Nicotiana benthamiana* были использованы в качестве “фабрики” для получения рекомбинантных белков медицинского назначения с помощью транзientной экспрессии генов.

## 1.2. Векторы на основе генома X вируса картофеля.

Для транзientной экспрессии в растениях требуются специальные экспрессионные вектора. В качестве кассеты экспрессии таких векторов может быть как нереплицирующаяся последовательность (например, промотор – ген интереса – терминатор), так и вирусные геномы, которые позволяют воспроизводиться вирусу в растении

В 1984 году [Ahlquist *et al.*, 1984] впервые *in vitro* была синтезирована инфекционная кДНК копия вируса мозаики костра (BMV, brome mosaic virus). Растительные вирусные векторы стали широко применяться для экспрессии различных белков в растениях [Komarova *et al.*, 2010].

Вирусные векторы разработаны на основе различных вирусов растений. Самыми популярными являются вирус табачной мозаики (TMV, tobacco mosaic virus) и X вирус картофеля (PVX, potato X virus). Также получены векторы на основе таких вирусов, как вирус мозаики люцерны (Alfalfa mosaic virus, Alfamovirus) [Lico *et al.*, 2008; Yusibov *et al.*, 1997], вирус мозаики бамбука (Bamboo mosaic virus, Potexvirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус курчавости верхушки свеклы (Beet Curly top virus, Curtovirus) [Hefferon *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2011; Hefferon *et al.*, 2014], вирус желтой мозаики ячменя (Bean yellow dwarf virus, Mastrevirus) [Ibrahim *et al.*, 2017; Hefferon *et al.*, 2017; Hefferon *et al.*, 2014; French *et al.*, 1986], вирус мозаики костра (Brome mosaic virus, Bromovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017; French *et al.*, 1986], вирус некротического пожелтения жилок свеклы (Beet necrotic yellow vein virus, Benyvirus) [Jiang *et al.*, 2019], вирус крапчатости стручков фасоли (Bean pod mottle virus, Comovirus) [Zhang *et al.*, 2010], вирус полосатой мозаики ячменя (Barley stripe mosaic virus, Hordeivirus) [Mellado-Sánchez *et al.*, 2020; Mortimer *et al.*, 2020], вирус мозаики цветной капусты (Cauliflower mosaic virus, Caulimovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус желтой мозаики фасоли (Catharantus yellow mosaic virus, Begomovirus) [Mortimer *et al.*, 2020], вирус зелёной крапчатой мозаики огурца (Cucumber green mottle mosaic virus, Tobamovirus) [Ooi *et al.*, 2006], вирус мозаики огурца (Cucumber mosaic virus,

Cucumovirus) [Tavares-Esashika *et al.*, 2020; Lico *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2017], вирус мозаики коровьего гороха (Cowpea mosaic virus, Comovirus) [Lico *et al.*, 2008; Nagyová *et al.*, 2007], вирус тристезы цитрусовых (Citrus tristeza virus, Closterovirus) [Dawson *et al.*, 2014], Foxtail mosaic virus (Potexvirus) [Bouton *et al.*, 2018], вирус кольцевой пятнистости гибискуса (Hibiscus chlorotic ringspot virus, Betacarmovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус кольцевой пятнистости одонтоглоссума (Odontoglossum ringspot virus, Tobamovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017; Dawson *et al.*, 2014], вирус мозаики папайи (Papaya mosaic virus, Potexvirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус раннего потемнения гороха (Pea early browning virus, Tobravirus) [Bouton *et al.*, 2018], вирус кольцевой пятнистости перца (Pepper ringspot virus, Tobravirus) [Tavares-Esashika *et al.*, 2020], вирус оспы слив (Plum pox potyvirus, Potyvirus) [Lico *et al.*, 2008; Hefferon *et al.*, 2017; Tavares-Esashika *et al.*, 2020; Dolja *et al.*, 1992], X вирус картофеля (Potato virus X, Potexvirus) [Комарова и др. 2006; Lico *et al.*, 2008; Nagyová *et al.*, 2007], вирус мозаики конопли (Sun hemp mosaic virus, Tobamovirus) [Liu *et al.*, 2010], вируса кустистой карликовости томатов (Tomato bushy stunt virus, Tombusvirus) [Lico *et al.*, 2008; Nagyová *et al.*, 2007], вирус гравировки табака (Tobacco etch virus, Potyvirus) [Dolja *et al.*, 1992], вирус золотой мозаики томатов (Tomato golden mosaic virus, Begomovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус зеленой мозаики табака (Tobacco mild green mosaic virus, Tobamovirus) [Liu *et al.*, 2010], вирус табачной мозаики (Tobacco mosaic virus, Tobamovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус мозаики томатов (Tomato mosaic virus, Tobamovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], Triticum mosaic virus (Tritimovirus) [Yang *et al.*, 2013], вирус погремковости табака (Tobacco rattle virus, Tobravirus) [Peyret *et al.*, 2015], вирус просветления жилок репы (Turnip vein-clearing virus, Tobamovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус желтой карликовости табака (Tobacco yellow dwarf virus, Mastrevirus) [Hefferon *et al.*, 2014], вирус карликовости пшеницы (Wheat dwarf virus, Mastrevirus) [Matzeit *et al.*, 1991], вирус желтой мозаики репы (Turnip yellow mosaic virus, Tymovirus) [Ibrahim *et al.*, 2017], вирус полосатой

мозаики пшеницы (Wheat streak mosaic virus, Tritimovirus) [Yang *et al.*, 2013], вирус желтой мозаики цукини (Zucchini yellow mosaic virus, Potyvirus) [Arazi *et al.*, 2002].

X вирус картофеля (род Potexvirus, семейство Alphaflexiviridae, отряд Tymovirales) – один из наиболее интенсивно изучаемых вирусов картофеля. X вирус картофеля имеет вирионы нитевидной формы. Длина частиц 445-775 нм, диаметр частиц 11-15 нм. Геном PVX представляет собой одноцепочечную (+) смысловую РНК размером примерно 6,4 т.п.н. [Скрябин и др., 1988]. Геномная РНК имеет 5'-кэп и полиаденилирован на 3'-конце. Геном содержит пять открытых рамок считывания (ORF), кодирующих пять белков: РНК-зависимую РНК-полимеразу (RDRP), тройной блок генов транспортных белков (TGB1, TGB2 и TGB3) и белок оболочки (CP). Геном содержит три субгеномных промотора перед генами TGB1, TGB2 и CP. TGB3 экспрессируется посредством сканирования с субгеномной мРНК TGB2 (“leaky scanning”) (рис. 1.2.1).

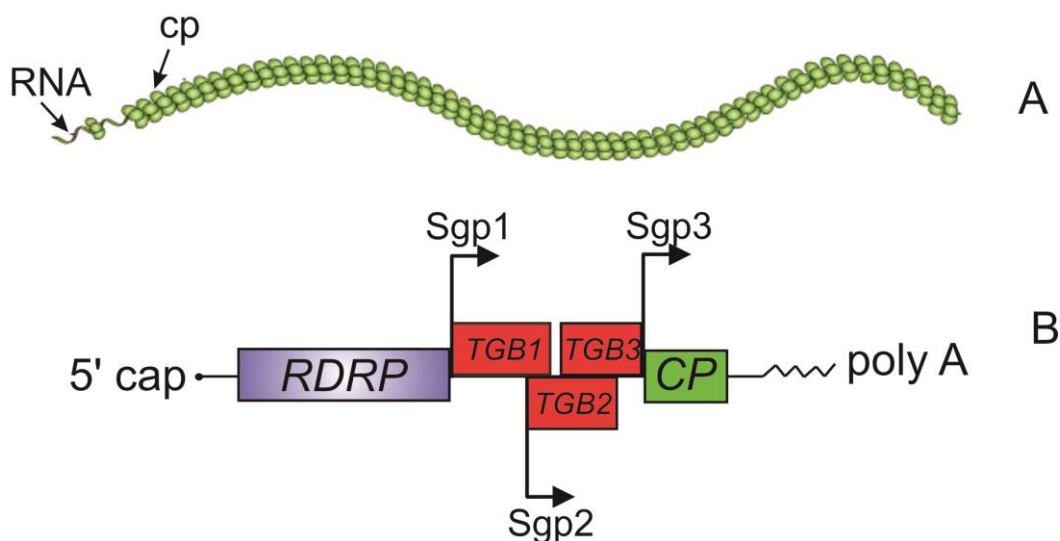


Рисунок 1.2.1. Структура вириона (А) и генома (В) X-вируса картофеля. Показаны гены РНК-зависимой РНК полимеразы (RDRP), тройной блок генов (TGB1, TGB2 и TGB3), ген белка оболочки (CP), Sgp1, Sgp2, Sgp2 – промоторы субгеномных РНК ХВК.

Первый вектор на основе генома X вируса картофеля был разработан в соответствии со стратегией “добавления гена”. Репортерный ген *gfp*,

кодирующий зеленый флуоресцентный белок, был клонирован под контролем третьего субгеномного промотора PVX. Данная конструкция была клонирована под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты [Baulcombe *et al.*, 1995]. Стабильность данного вектора зависит от длины репортерного гена [Avesani *et al.*, 2007]. В связи с этим на основе PVX были созданы векторы с делециями. Был создан вектор, в котором ген белка оболочки CP был заменен на ген *gfp* или гены легкой / тяжелой цепи антитела [Giritch *et al.*, 2006]. Удаление гена CP привело к более высокому уровню экспрессии целевого белка. Другая группа сконструировала PVXdt – GFP вирусный вектор за счет делеции тройного блока генов и гена CP. Ген *gfp* был помещен под контроль первого субгеномного промотора PVX [Komarova *et al.*, 2006]. Данный вариант вектора полностью лишен возможности распространения по растению, но дает значительное увеличение продукции целевого белка в растениях (рис. 1.2.2). Другая стратегия в векторном дизайне на основе PVX использует слияние белка-мишени с CP. Есть два варианта: целевой белок слит с N-концом CP [Uhde *et al.*, 2005] или связан с CP через каталитический пептид 2A вируса ящура. Последовательность 2A способствует котрансляционному расщеплению присоединенного белка и поддерживает инфекционность вируса [Santa Cruz *et al.*, 1996].

В данной работе разработана серия экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля для производства в растениях *Nicotiana benthamiana* рекомбинантных белков медицинского назначения.

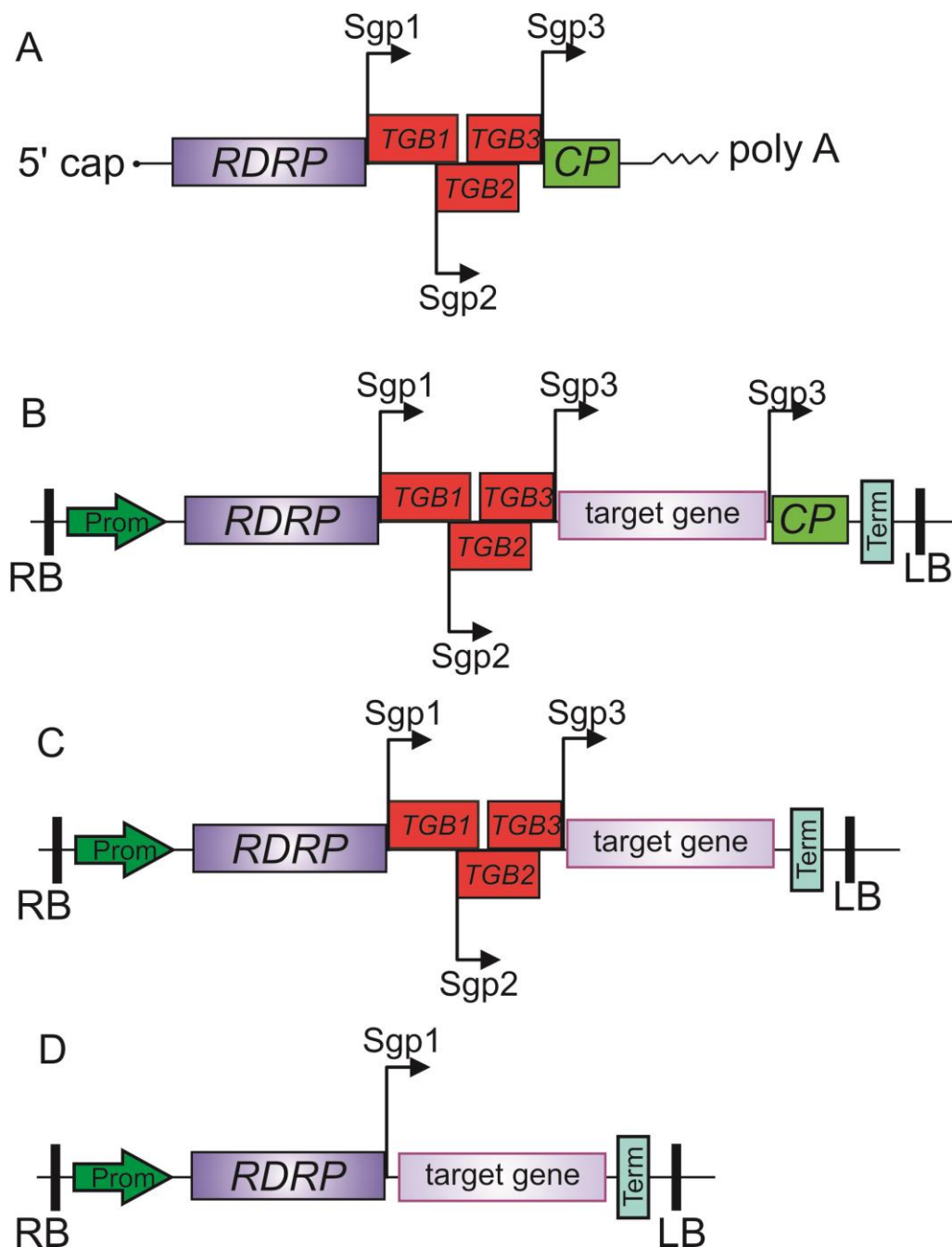


Рисунок 1.2.2. Структура генома X-вируса картофеля (A) и экспрессионных векторов на его основе (B, C, D). Показаны гены РНК-зависимой РНК полимеразы (RDRP), тройной блок генов (TGB1, TGB2 и TGB3), ген белка оболочки (CP), Sgp1, Sgp2, Sgp2 – промоторы субгеномных РНК ХВК; Prom – промотор, Term – терминатор, *target gene* – целевой ген, LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

### 1.3. Вирус гриппа.

Грипп – острое вирусное заболевание человека, характеризующееся поражением респираторного тракта, лихорадкой, общей интоксикацией, нарушением деятельности сердечно-сосудистой и нервной систем.

В 1931 г. американский вирусолог Р. Шоуп, изучая грипп свиней, установил вирусную природу заболевания. В последующем возбудитель этой инфекции был назван *Influenzavirus A*. В 1933 г. вирус гриппа А от человека изолировали английские вирусологи Уилсон Смит, Кристофер Эндрюс и Патрик Лейдлоу путем заражения хорьков ультрафильтратом носоглоточного смыва больного гриппом человека. В России вирус гриппа типа А впервые выделили А.А. Смородинцев в 1936 г. в Санкт-Петербурге и Л.А. Зильбер в 1937 г. в Москве.

В 1940 г. американский микробиолог Т. Фрэнсис выделил вирус гриппа типа В. В 1947 г. Ричард Тэйлор выделил вирус гриппа типа С.

Вирусы гриппа принадлежат к семейству *Orthomyxoviridae*. Вирусами гриппа называют монотипные роды *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus* (до октября 2018 года назывались *Influenzavirus A*, *B*, *C* и *D*), каждый из них состоит только из одного вида.

Общим признаком для семейства *Orthomyxoviridae* является наличие сегментированной одноцепочечной минус-цепи РНК в геноме. Антигенные свойства внутренних белков вириона (М1 и NP) определяют принадлежность вируса гриппа к роду. Для вирусов гриппа характерна высокая изменчивость антигенной структуры. Существует 18 разных подтипов гемагглютининов (НА1-НА18) и 11 разных подтипов нейраминидаз (NA1-NA11) для вирусов гриппа А. С 1980 года по рекомендации ВОЗ в обозначение штаммов вирусов гриппа включают [Букринская. 1986]:

- тип;
- место выделения (географическое происхождение штамма);
- индекс, присвоенный в лаборатории (порядковый номер штамма);
- год выделения;



- (только для вирусов животных) название животного, являющегося естественным хозяином вируса (от которого выделен вирус);
- индекс поверхностных белков, ставится последним и заключается в скобки, имеет смысл только для вируса типа «А».

Вирусы гриппа имеют большой эпидемический потенциал из-за высокой антигенной изменчивости, в результате мутационного («дрейф») и реассортационного («шифт») процессов. Сегментированный геном и наличие большого числа переносчиков обеспечивает генетическую рекомбинацию и прямую передачу от животных и птиц к человеку. Примером может служить случай появления высокопатогенных штаммов «птичьего» гриппа А H5N1 в странах Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока. Примерами преодоления межвидового барьера служат случаи инфицирования людей вирусами гриппа А птиц и свиней субтипов H5N1, H9N2, H7N3, H7N2 в странах Юго-Восточной Азии, некоторых странах Европы и США [Peiris *et al.*, 1999].

Антигенный дрейф является результатом накопления точечных мутаций, т.к. РНК-полимеразы могут делать ошибки в процессе репликации. Такой процесс привел к накоплению многочисленных субтипов гриппа А с различными типами гемагглютининов и нейраминидаз. Антигенный шифт – результат рекомбинации генов вируса гриппа при смешанной инфекции с двумя или более подтипов вирусов (реассортации). За счет этого механизма, вирусы через множество комбинаций различных HA и NA подтипов.

Часто возникновение пандемических вирусов гриппа у людей связано с вирусами гриппа, циркулирующими среди птиц. Птичий вирус H1N1 адаптировался к человеческому организму (дрейф) и вызвал испанский грипп в 1918. Азиатский грипп в 1957 году возник в человеческой популяции путем реассортации с птичьим вирусом H2N2, и приобрел его H2 (HA), N2 (NA), PB1 гены. Аналогичное событие реассортации с птичьим вирусом гриппа (H3 (HA) и PB1 генов) произошло в 1968 году, что привело к появлению Гонконгского гриппа (H3N2). В 2009 году, в результате реассортации трёх вирусов: человеческого H3N2, свиного H1N1 и северо-американского

птичьего возникли свиные вирусы H3N2 и H1N2, которые рекомбинировали со свиным птицеподобным вирусом, в результате возник свиной вирус H1N1, который очень похож на штамм, циркулировавший в середине 1950х годов [Neumann *et al.*, 2009] (рис. 1.3.1).

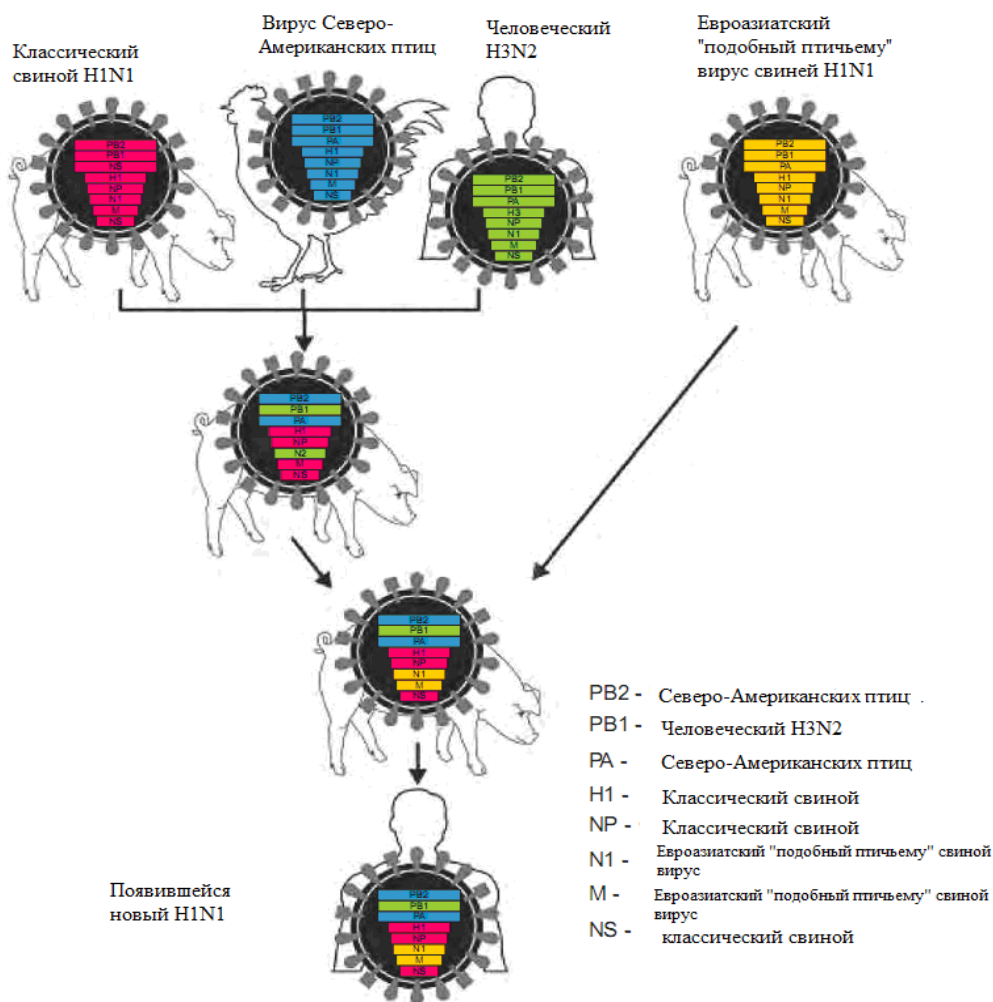


Рисунок 1.3.1. Происхождение геномной организации свиного вируса гриппа H1N1 [Neumann *et al.*, 2009].

Вирус гриппа представляет собой оболочечный вирус: внешний слой — липидная мембрана, в которую вставлены «шипы»: гликопротеины и матриксный белок M2, формирующий ионные каналы. Под липидной мембраной расположен матричный (матриксный) белок M1, он формирует внутренний слой оболочки вируса, придает устойчивость и жесткость внешней липидной оболочке. Вирион имеет форму сферическую форму, его диаметр 100–120 нм.

Гемагглютинин и нейраминидаза — ключевые белки для размножения вируса типов «А» и «В». Гемагглютинин используется для проникновения в клетку, нейраминидаза — для выхода из неё.

Внутри вириона находится геном вируса. Геном представлен в виде рибонуклеопротеинового комплекса vRNP (нуклеопротеин в комплексе с геномной РНК вируса), который содержит фрагменты РНК, прикрепленные к белку нуклеопротеину (NP), и три белка полимеразного комплекса: PB1, PB2 и PA. Внутренняя часть вириона также включает белок NEP. У вируса типа «А» 8 фрагментов РНК кодируют 11 белков: HA, M1 (англ. matrix 1), M2, NA, NP (англ. nucleocapsid protein), NS1 (англ. non-structural protein 1), NS2 (он же NEP, англ. nuclear export protein), PA (англ. polimerase acid), PB1 (англ. polymerase basic 1), PB1-F2 (англ. polymerase basic 1 frame 2), PB2 [Ghedini *et al.*, 2005]. Матриксный белок M1 и белок M2 кодируются сегментом М (рис. 1.3.2).

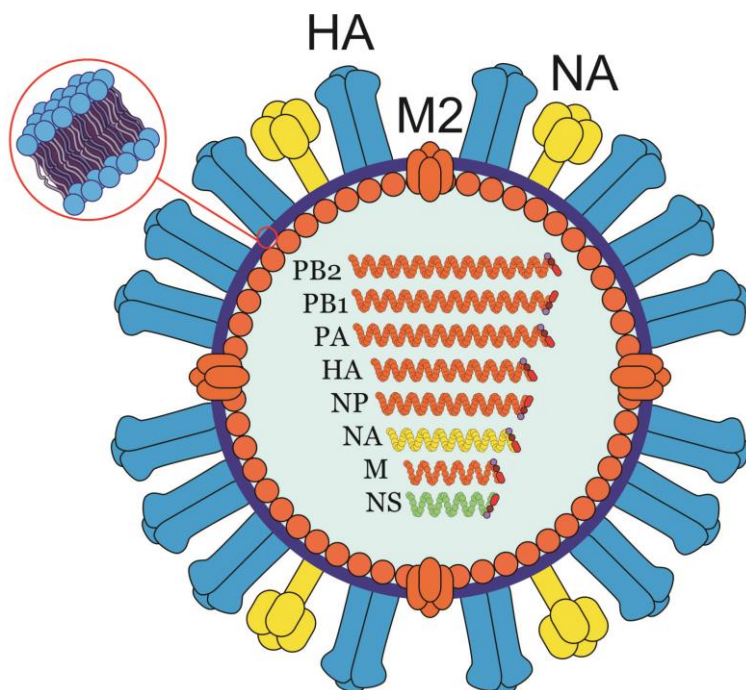


Рисунок 1.3.2. Структурная организация вируса гриппа А. Показаны поверхностные гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), а также белок M2 ионного канала.

## Гемагглютинин

Гемагглютинин (НА) – один из самых крупных белков в вирионе гриппа. Он выполняет ряд функций, которые важны для развития инфекционного процесса. НА участвует в прикреплении вируса к поверхности клетки и в проникновении в клетку, путем слияния вирусной мембраны с клеточной мембраной, также участвует в слиянии вирусной мембраны с эндосомальной при проникновении вируса внутрь клетки. Против НА направлен основной противовирусный иммунитет [Acheson *et al.*, 2011].

Поверхностный шип гемагглютинина представляет собой тример, состоящий из идентичных субъединиц, обозначаемых как НАО (молекулярная масса 75 кДа). Каждая из субъединиц состоит из двух полипептидов – НА1 (тяжелая цепь гемагглютинина) с молекулярной массой 55 кДа и НА2 (легкая цепь гемагглютинина) – молекулярная масса – 20 кДа. Тяжелые и легкие цепи необходимы для проникновения вируса в клетку и для формирования инфекционной частицы на последнем этапе репродукции вируса. НА является белком, который встраивается в мембрану эндоплазматического ретикулума и транспортируется через аппарат Гольджи к плазматической мембране, где он включается в мембрану вирионов. НА2 содержит гидрофобный фьюжн-пептид на N-конце. Его последовательность из 23 аминокислот состоит из нескольких остатков гидрофобных аминокислот и остатков глицина. Гидрофобность и спиральная структура фьюжн-пептида считаются важным условием при взаимодействии НА с мембраной эндосомы. [Cross *et al.*, 2009].

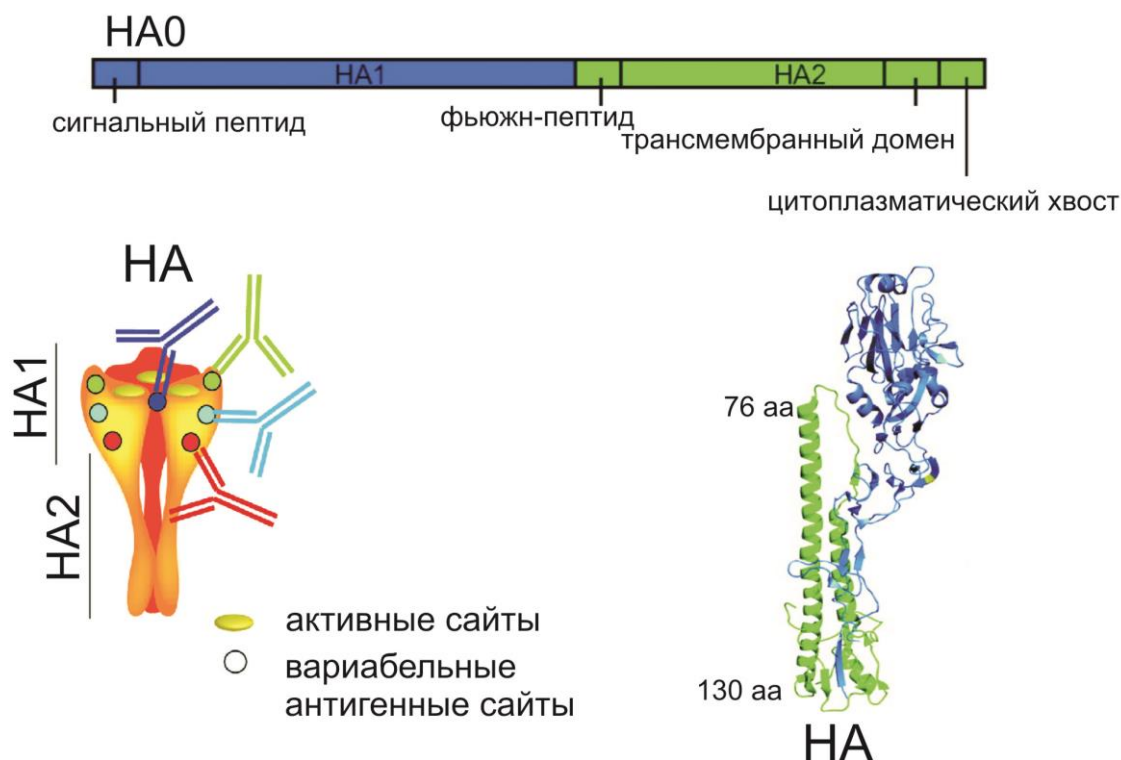
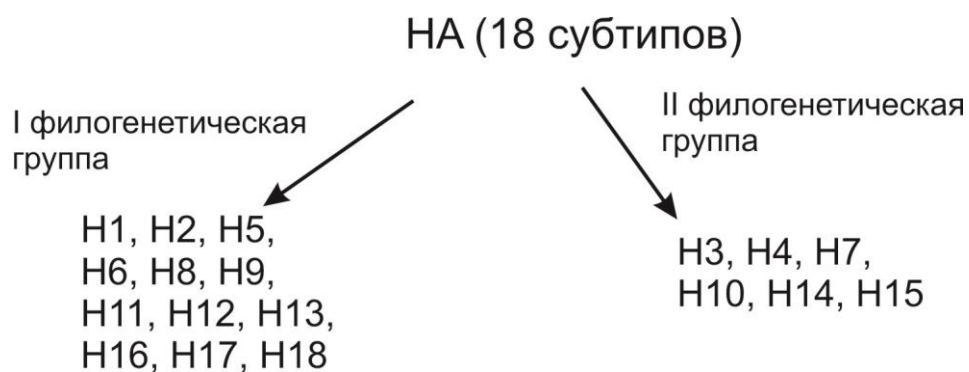


Рисунок 1.3.3. Структура гемагглютинина (НА) вируса гриппа. Полипептид НА протеолитически расщепляется на 2 субъединицы: НА1 и НА2. НА – тример, состоящий из трех одинаковых мономеров (НА0). НА состоит из стебля (из цепей НА1 и НА2) и глобулы (из НА1). Для A/mallard/Sweden/5/2005: 1-15 аа: сигнальный пептид; 16-340 аа: НА1; 341-562 аа: НА2.

По последовательности стебля можно выделить две филогенетические группы НА.



Хотя белок НА сильно варьирующ, его вторая субъединица (НА2), образующая домен стебля, относительно консервативна [Krystal *et al.*, 1982], особенно в пределах конкретной филогенетической группы белков НА.

В нативной молекуле HA2 аминокислотная область 76–130 aa образует альфа-спираль в районе 75–125 aa. После прикрепления к рецептору на клетке-мишени вирус интернализуется посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. При низком pH в эндосоме эта часть HA2 (76–130 aa) перестраивается, и изменяется ее конформация. Новая структура состоит из части длинной альфа-спирали (38–106 aa), петли (106–112 aa) и короткой спирали (112–125 aa). Конформационные изменения отражаются в повышенной реактивности моноклональных антител (mAb), распознающих соответствующие эпитопы HA2 [Staneckova *et al.*, 2010]. Мышиный mAb 12D1 связывает аминокислоты в высоко консервативной области длинной альфа-спирали HA2 из вируса подтипа H3 – точнее, в участке 76-106 [Wang *et al.*, 2010] (рис. 1.3.3). Позже было обнаружено, что наилучшее связывание обеспечивается структурой, содержащей аминокислоты 76-130. Было показано, что вакцина-кандидат, основанная на этом пептиде, соединенном с гемоцианином (KLH, keyhole limpet hemocyanin), обладает активностью против вирусов гриппа обеих филогенетических групп (H3, H5, H1) [Wang *et al.*, 2010].

### *Нейраминидаза*

Нейраминидаза (NA) – это поверхностный гликопротеин, который удаляет сиаловую кислоту во время образования вирусных частиц, покидающих клетку, с которой связан HA, поскольку без этого частица не может освободиться от поверхности клетки и участвовать в следующем цикле заражения. Нейраминидаза вируса гриппа состоит из 469 аминокислот. N-конец нейраминидазы представляет собой небольшой цитоплазматический хвост, за которым следует трансмембранный домен. Далее следует область, которая называется неструктурной областью или "стеблем", который прикреплен к вирусной мембране. Этот сайт участвует в посттрансляционных модификациях [Kundu *et al.*, 1996]. Активный сайт нейраминидазы расположен в области от 118 до 425 aa и отвечает за связь с

сиаловыми кислотами [Gong *et al.*, 2007]. Нейраминидазный шип на поверхности вириона представлен тетрамером. Тетрамер имеет четыре активных центра. Все сайты гликозилирования нейраминидазы расположены в глобуле.

### *Мембранный белок М1*

Внутренняя поверхность липидного слоя мембраны вириона вируса гриппа выстлана матричным белком М1. Этот мембранный белок обеспечивает контроль экспорта РНК из ядра и почкование вируса. М1 состоит из N-концевого домена (1–87 аа), центрального домена (87–165 аа) и С-концевого домена (165–252 аа.). На границе между центральным и С-концевым доменами находится домен цинковых пальцев (Zn-finger motif). Этот регион отвечает за связь с одноцепочечной вирусной РНК [Golebiewski *et al.*, 2011].

### *Нуклеопротеин*

Нуклеопротеин (NP) представляет собой внутренний белок вирусной частицы. NP нужен для репликации, а также он участвует в контроле транспорта РНК в ядро. NP связывает РНК для транскрипции вирусного генома [Moeller *et al.*, 2012]. Дополнительно нуклеопротеин участвует в транспорте вирионной РНК как в ядро клетки, так и из ядра к месту сборки вириона [Boulo *et al.*, 2007; Cros *et al.*, 2005].

### *РНК-зависимая-РНК-полимераза*

РНК-зависимая-РНК-полимераза является мультифункциональным комплексом и состоит из пяти белков: PB1, PB1-F2, N40, PB2 и PA. Белки PB1, PB2 и PA взаимодействуют с двумя концами каждого фрагмента вирусной РНК. Кроме этого, комплекс PB1 и PB2 взаимодействует с NP. К функциям отдельных белков относится PB2 (полимеразная субъединица, отвечающая за распознавание 5'-концевого кэпа мРНК), PB1 (полимеразная

субъединица, обладающая эндонуклеазной активностью и обеспечивающая элонгацию РНК), PB1-F2 (виropорин, вызывает образование пор в митохондриях и индуцирует апоптоз), PA (полимеразная субъединица с протеазной активностью).

### *Мембранный белок M2*

Матричный белок M2 (matrix protein) является трансмембранным белком. На поверхности вирионов гриппа его немного (16-20 молекул на вирион). Однако на поверхности инфицированных клеток хозяина он представлен в большем количестве [Sui *et al.*, 2009].

Белок M2 играет роль ионного канала, функцией которого является транспорт протонов, это необходимо для эффективной репродукции вируса. Данный канал регулирует pH среды, а также может взаимодействовать с белком теплового шока Hsp40 (heat shock protein 40). Hsp40 связывается с ингибитором протеинкиназы R (белком p58), в результате образования комплекса M2-Hsp40-p58 происходит фосфорилирование протеинкиназы R и клеточная гибель [Guan *et al.*, 2010].

Мембранный белок M2 является гомотетрамером [Pinto and Lamb, 2006]. Мономер белка включает 97 аминокислотных остатков и разделен на следующие области: N-концевой домен или эктодомен (23 aa); трансмембранный домен (19 aa), расположенный внутри липидного бислоя клеточной мембраны; C-концевой цитоплазматический домен (54 aa), который находится в цитоплазме. [Gonzalez and Carrasco, 2003]. Внешний и трансмембранный домены образуют ионный канал, который регулирует pH среды в процессе разборки вируса в эндосомах, а также в аппарате Гольджи. Канал состоит из четырех параллельных мономеров, связанных дисульфидными мостиками. две аминокислоты His37 и Trp41 определяют селективность канала и его однонаправленность [Pinto and Lamb, 2006].

На начальных стадиях инфекции транспорт протонов внутрь вирусной частицы приводит к образованию кислой среды, в результате чего



происходит диссоциация M1 белка и RNP, а также конформационные изменения гемагглютинина, слияние эндосомальной мембраны с вирусной и выход вирусного RNP в цитоплазму. Предполагается, что на поздних стадиях инфекции ионный канал M2 поддерживает рН во время синтеза НА в аппарате Гольджи инфицированной клетки, предотвращая изменения конформации НА [Pinto and Lamb, 2006].

Канал, образованный M2 белком, проводит протоны не при любых условиях. Внутри эндосомы, куда направлены N - концевые эктодомены, рН должен быть ниже рН 7.0. Канал закрыт, когда рН снаружи превышает рН 7,5 и открыт, когда рН снаружи ниже, чем 6,5. Таким образом, высокий рН снаружи закрывает канал, а низкий рН открывает канал. Есть свидетельства, что Trp41 является ключевой аминокислотой для активации и закрытия поры в канале [Pinto and Lamb, 2006].

Противовирусные препараты, которые подавляют работу M2 ионного канала, ингибируют репликацию вируса гриппа. Вирусный геном кодирует три интегральных мембранных белка и только M2 способен осуществлять протонный транспорт. Таким образом, ингибирование протонного транспорта ведет к ингибированию репликации вируса. Такие ингибиторы, как амантадин и ремантадин связываются с M2 белком и угнетают работу ионного канала. Они использовались в течение многих лет в качестве противовирусных препаратов. Ремантадин связывается в четырех позициях ионного канала вблизи триптофанового входа на липидной стороне и стабилизирует закрытую конформацию поры.

Цитоплазматический хвост M2 белка имеет форму альфа-спирали, у которой одна сторона гидрофобная, а другая — гидрофильная. Данная область участвует в процессе упаковки вирионной РНК и отпочковывания вириона [Castrucci and Kawaoka, 1995; McCown and Pekosz, 2006].

### *Современные вакцины против вируса гриппа*

Разработка вакцин от гриппа началась в конце 1930-х годов. Самые первые вакцины содержали цельные вирусные частицы. Это могли быть живые частицы (аттенуированные) или убитые (инактивированные). Вирус выращивали в куриных эмбрионах, а затем инактивировали. Большинство современных вакцин от гриппа также получают на куриных эмбрионах.

Живая гриппозная вакцина, впервые предложенная А.А. Смородинцевым в 1938 г., успешно применялась в России (СССР) с 1954г. В настоящее время такая вакцина применяются редко, и сейчас ей на смену пришли инактивированные варианты. Инактивированные вакцины содержат вирус гриппа, который подвергается UV или химической инактивации и фрагментации с последующим выделением отдельных белковых компонентов.

По технологии изготовления инактивированные вакцины принято делить на три группы: цельновирионные, расщепленные (сплит), субъединичные [Киселев и др., 2012]. Цельновирионные вакцины состоят из целых вирионов вируса гриппа («Микрофлю»). Расщепленные вакцины производят из инактивированных расщепленных вирусов гриппа. Они содержат поверхностные и внутренние антигены («Ваксигрип»). В некоторых расщепленных вакцинах антигены представлены в виде вирусом. Такие вакцины называют виросомальными («Инфлексал V»). Субъединичные состоят только из поверхностных протективных антигенов – гемагглютинаина и нейраминидазы. Они являются препаратами с наиболее высокой степенью очистки от компонентов вируса и соответственно наименее реактогенны («Инфлювак») (рис. 1.3.4).

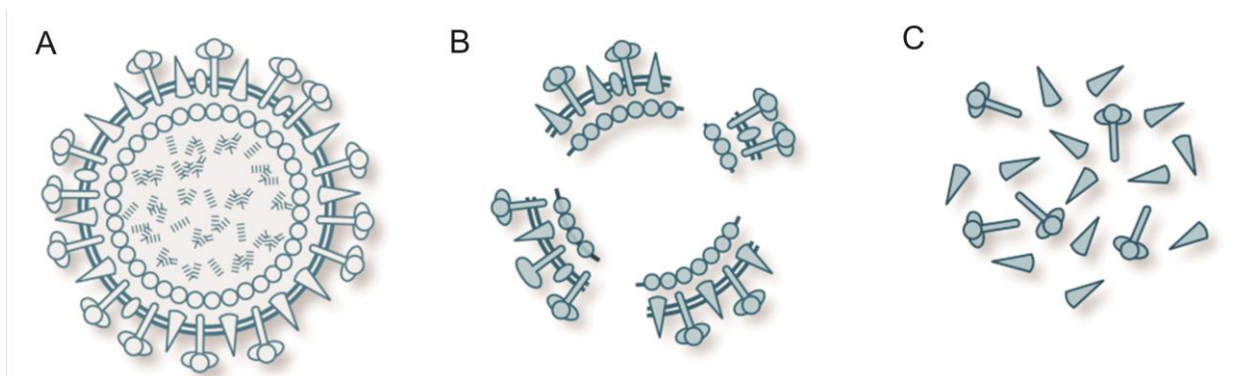


Рисунок 1.3.4. Виды антигенов инактивированных вакцин. Инактивированный вирусный вирион в цельновирионной вакцине (А). Расщепленный инактивированный вирион в сплит-вакцине (В). Частички антигена в субъединичной вакцине (С) [Nabel *et al.*, 2013].

Поверхностные антигены – гемагглютинин и нейраминидаза – являются целью для иммунной системы. В настоящее время лицензированы вакцины от гриппа, которые вызывают защитный ответ, направленный в основном на вирусные НА и NA. Ввиду высокой изменчивости этих белков, вакцинные препараты от гриппа обновляются ежегодно.

Ежегодно ВОЗ дает рекомендации по составу вакцин от гриппа: в феврале — для северного полушария, в сентябре — для южного. Как только составы обнародованы, и производители получают вакцинные штаммы, запускается процесс производства, на который уходит около полугода.

Состав противогриппозных вакцин все время меняется: например, в сезоне 2019–2020 были заменены оба штамма вируса типа А, и в итоге в четырехкомпонентную вакцину вошли А/Brisbane/02/2018 (H1N1); А/Kansas/14/2017 (H3N2); В/Colorado/06/2017 (В/Victoria/2/87) и В/Phuket/3073/2013 (В/Yamagata/16/88).

Прогнозы ВОЗ хорошо предсказывают антигенность сезонных штаммов, но постоянные генетические изменения могут привести к антигенным различиям за короткий период времени, что повлияет на эффективность вакцин. Поэтому актуальной задачей является создание универсальной вакцины. В состав такой вакцины должны входить

высококонсервативные эпитопы вирусных частиц, которые присутствуют во всех популяциях вируса гриппа.

Кандидатами для создания универсальной вакцины могут быть несколько белков: HA (участки стебля), внутренние антигены M1 и NP, внешний домен трансмембранного белка M2 (M2e), консервативный участок NA [Palese and Garcia-Sastre, 2002; Gerhard *et al.*, 2006].

#### *Эктодомен матричного белка M2 в качестве кандидата для создания универсальной вакцины*

M2e представляет собой N-концевую последовательность белка M2, состоит из 23 аминокислот. Аминокислотная последовательность M2e пептида высоко консервативна. Данный белок в настоящий момент широко используется при разработке рекомбинантных вакцин от вируса гриппа А.

В 2005 году были проанализированы последовательности 23 aa внешнего региона M2 (M2e) у 716 вирусов гриппа А. В результате было установлено, что 17 из 23 aa консервативны [Fiers *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005] (таблица 1.3.1).

Белок M2, как и M1, обладает значительно меньшей изменчивостью по сравнению с HA и NA. В отличие от белка HA, M2e белок недоступен для антител. Однако, M2e-специфические антитела связываются с вирус-инфицированными клетками, на поверхности которых M2 присутствует в значительном количестве, и активируют антитело – зависимую клеточную цитотоксичность [Huber *et al.*, 2001], а также комплемент - зависимую цитотоксичность и активируют гибель клеток с помощью натуральных киллеров (NK).

Использование M2e пептида в качестве противогриппозной вакцины ограничивается его низкой иммуногенностью. Для повышения иммуногенности используются различные носители и адъюванты.

Таблица 1.3.1. Сравнение аминокислотных последовательностей M2e пептидов различных штаммов вируса гриппа человека и животных

Штамм вируса гриппа	Субтип	Хозяин	Аминокислотная последовательность внешнего домена М2 белка
<i>Консенсусная последовательность</i>			<b>SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD</b>
A/New Caledonia/20/99	H1N1	Человек	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	Человек	SLLTEVETPIRNEWGCRCN <u>G</u> SSD
A/FM/1/47-MA	H1N1	Человек	SLLTEVETP <u>T</u> KNEW <u>E</u> CRCNDSSD
A/Berkely/1/68	H2N2	Человек	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Hebei/19/95	H3N2	Человек	SLLTEVETPIRNEWGCRCN <u>G</u> SSD
A/Philippines/82	H3N2	Человек	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Hong Kong/156/97	H5N1	Человек	SLLTEVET <u>L</u> TRN <u>G</u> WGRC <u>S</u> DSSD
A/Viet Nam/1203/04	H5N1	Человек	SLLTEVETP <u>T</u> RNEW <u>E</u> CRC <u>S</u> DSSD
A/Hong Kong/1073/99	H9N2	Человек	SLLTEVET <u>L</u> TRN <u>G</u> W <u>E</u> CK <u>R</u> DSSD
A/Chicken/Kurgan/05/05	H5N1	Птица	SLLTEVETP <u>T</u> RNEW <u>E</u> CRC <u>S</u> DSSD
A/Duck/ Potsdam1402-6/86	H5N2	Птица	SLLTEVETP <u>T</u> RN <u>G</u> W <u>E</u> CK <u>S</u> DSSD
A/Chicken/Hong Kong/G9/97	H9N2	Птица	SLLTEVETP <u>T</u> RN <u>G</u> WGRC <u>S</u> <u>G</u> SSD
A/California/4/09	H1N1	Свинья	SLLTEVETP <u>T</u> R <u>S</u> EW <u>E</u> CRC <u>S</u> DSSD

В качестве носителей M2e пептида использовались различные белки, среди которых глутатион-S-трансфераза [Liu *et al.*, 2004], гемоцианин морского моллюска фиссуреллии [Tomprkins *et al.*, 2007], лейциновый доменом транскрипционного фактора дрожжей GCN4 [De Filette *et al.*, 2008], С - домен белка теплового шока *Mycobacterium tuberculosis* [Ebrahimi *et al.*, 2011], Липосомы [Ernst *et al.*, 2006].

#### *Ядерный антиген вируса гепатита В в качестве носителя M2e пептида вируса гриппа А*

Для увеличения иммуногенности антигенов используют белковые носители, которые могут представлять на своей поверхности антиген в достаточно большом количестве. Было показано, что ядерный антиген вируса гепатита В может быть использован в качестве носителя антигенов.

Ядерный антиген вируса гепатита В (Нbc) содержит два участка введения чужеродных эпитопов [Fiers *et al.*, 2004]. К данным участкам относится N-конец и иммунодоминантная петля (район 75 – 85 aa). Каждая субъединица

является димером. Наночастицы ядерного антигена образуются за счет самосборки этих субъединиц. Ядерный антиген вируса гепатита В образует наночастицы двух видов: 30 nm (состоит из 90 субъединиц) и 34 nm (120 субъединиц).

При клонировании гена зеленого флуоресцентного белка на N-конец и в район иммунодоминантной петли Нвс образование наночастиц не нарушилось (рис. 1.3.5). Таким образом, было продемонстрировано, что в мономеры Нвс возможно включение довольно больших фрагментов без нарушения их свойств [Kratz *et al.*, 1999].

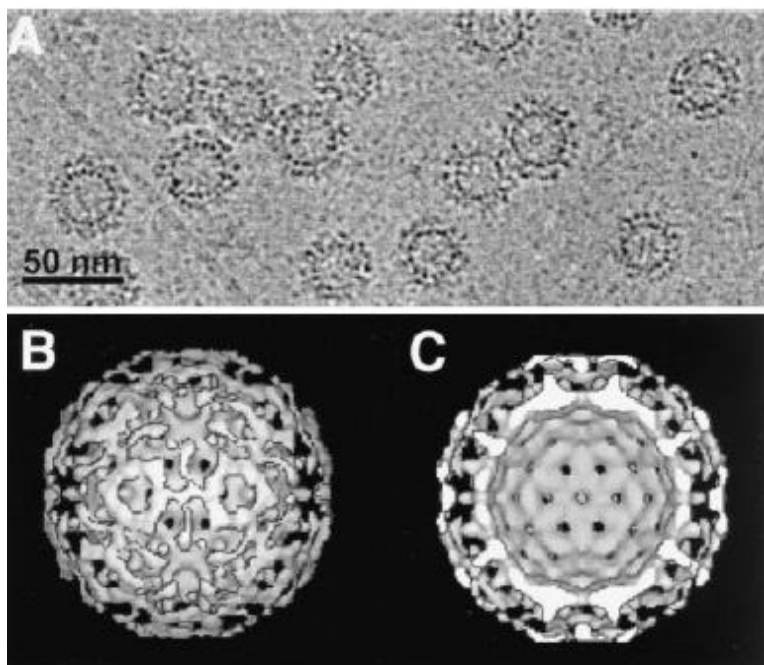


Рисунок 1.3.5. Структурн наночастиц Нвс с включенным белком GFP. А, электронная микроскопия наночастиц, образованных из рекомбинантных субъединиц; В, реконструкция модели НвсGFP-частиц; С, экваториальный срез НвсGFP-частицы [Kratz *et al.*, 1999].

Способность субъединиц НвсAg к ассоциации сильно зависит от пептидов, включенных в иммунодоминантную петлю. Увеличение размера или некоторые свойства эпитопов могут нарушить способность субъединиц ядерного антигена к самосборке [Wanli Liu *et al.*, 2003]. Если эпитоп включен в иммунодоминантную петлю, то добавление глициновых линкеров к

ядерному антигену позволяет субъединицам ядерного антигена принимать конформацию, необходимую для их ассоциации с образованием вирусоподобных частиц [Heermann *et al.*, 1984; Böttcher *et al.*, 1998]. Глициновые линкеры увеличивают количество степеней свободы белка, облегчая процесс фолдинга.

В данной работе разработаны методы получения кандидатных вакцин от вируса гриппа А в растениях. Кандидатные вакцины основаны на консервативных антигенах вируса гриппа, таких как М2е пептид и фрагмент НА, что предполагает получение универсальной вакцины от гриппа.

#### 1.4. Рекомбинантные вакцины против вируса гриппа А на основе М2е пептида, разрабатываемые в растениях.

Несмотря на успехи в разработке традиционных вакцин против гриппа, высокая изменчивость поверхностных белков вируса, гемагглютинина и нейраминидазы, приводит к частому появлению новых эпидемических штаммов, что требует регулярного обновления вакцин [Webster *et al.*, 1992]. Использование консервированных вирусных антигенов позволило бы разработать “универсальные” вакцины, эффективные против широкого спектра штаммов гриппа.

Трансмембранный белок М2 вируса гриппа А образует ионные каналы, состоящие из тетрамеров М2. М2е-это внеклеточный домен белка М2, состоящий из 23 аминокислот, является одним из наиболее перспективных кандидатов для создания «универсальной» вакцины, поскольку его последовательность практически не изменилась во всех изолятах гриппа человека с 1933 года. М2е отличается всего несколькими аминокислотами у штаммов гриппа А животного происхождения, хотя эти различия важны для специфичности иммунного ответа [Fiers *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 1991]. М2е является коротким и слабо иммуногенным пептидом [Feng *et al.*, 2006]; однако он становится высокоиммуногенным и обеспечивает защиту от инфекции при присоединении его к адьюванту или носителю [Fiers *et al.*, 2009; Neiryneck *et al.*, 1999; De Filette *et al.*, 2006].

Для разработки и получения в растениях вакцин-кандидатов на основе М2е было использовано несколько подходов (таблица 1.4.1). Среди них можно выделить два. Во-первых, вирусы растений или их капсидные белки могут быть использованы в качестве новых носителей М2е. Во-вторых, рекомбинантные белки, содержащие М2е, и вирусоподобные частицы, первоначально разработанные и полученные в других экспрессионных системах, также могут быть получены в растениях.



## *Вирусы растений и вирусоподобные частицы в качестве носителей M2e*

### *Слияние M2e с геном, кодирующим белок капсида вируса мозаики огурца (Cucumber Mosaic Virus)*

Немчинов и Натилла разработали систему представления эпитопов на основе белка оболочки вируса мозаики огурца, экспрессируемого с помощью вектора на основе X вируса картофеля [Natilla *et al.*, 2006], и использовали ее для разработки кандидатной вакцины на основе M2e пептида в растениях. M2e был присоединен к гену, кодирующему белок капсида вируса мозаики огурца (CMV) [Nemchinov *et al.*, 2007]. Последовательность M2e была клонирована во внутреннюю петлю bH–bI гена капсидного белка CMV (CP) [Xe *et al.*, 1998] между остатками глутаминовой кислоты (E-195) и треонина (T-196). Модифицированный CMV CP был клонирован в векторе на основе вируса картофеля X (PVX) (рис. 1.4.1 А). Весь вектор был клонирован под контроль промотора T7 в плазмидном векторе. Транскрипты были получены *in vitro* с использованием T7 РНК-полимеразы, кэпированы и механически инокулированы в листья *N. benthamiana*. Вирусный вектор PVX/CMV CP-M2e был инфекционным и вызывал симптомы вирусного заражения в листьях *N. benthamiana* через 5-7 дней после инокуляции [Nemchinov *et al.*, 2007].

Однако рекомбинантный вирус был нестабильным, и варианты дикого типа без вставки CMV CP появились через две недели после инокуляции. Уровни экспрессии белка CMV-M2e были приблизительно 6-8 мкг/г массы листьев (~ 0,1% от общего количества растворимого белка). Сборка рекомбинантных капсидных белков CMV в химерные VLPs, а также эффективность белка CMV-M2e в качестве вакцины в этих исследованиях продемонстрирована не была.

*M2e пептид на поверхности вируса мозаики коровьего гороха (CPMV, Cowpea Mosaic Virus)*

Аналогичный подход был использован в работе Rasochova *et al.* (The Dow Chemical Company, USA) в патенте WO2007/011904, где M2e пептид был представлен на поверхности частиц CPMV [Rasochova *et al.*, 2007]. M2e пептид (SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD) был клонирован в малый белок капсида (S) CPMV. Проростки коровьего гороха были инокулированы CPMV RNA1 и химерной CPMV RNA2. После инокуляции растения выращивали при температуре 25°C в течение двух – трех недель. Листья, у которых проявлялись симптомы инфекции, были собраны и использованы для изоляции VLP. Целостность собранных химерных частиц вируса CPMV оценивали с помощью хроматографии. Вестерн блот анализ показал, что химерные VLP распознаются антителами против M2e. Об иммуногенных свойствах этих частиц не сообщалось.

Использование CPMV было также продемонстрировано Meshcheriakova *et al.* [2009]. Для получения химерных вирусных частиц в растениях экспрессионные векторы, содержащие полноразмерные кДНК CPMV РНК-1 и РНК-2 между промотором 35S вируса мозаики цветной капусты и терминатором гена нопалинсинтазы (*nos*) были сконструированы на основе бинарного вектора pBINPLUS. При использовании CPMV эпитопы в основном клонируются в область между Ala22 и Pro23 в βV-βС петле белка оболочки S.

Для получения химерных частиц CPMV в растениях были сконструированы два бинарных вектора, несущих модифицированные гены, кодирующие белок S-оболочки CPMV, со вставками эпитопов M2e вирусов гриппа человека и птиц (рис. 1.4.1 В). Листья *Vigna unguiculata* инокулировали смесью двух культур *A. tumefaciens*, содержащих бинарные векторы, несущие копии кДНК CPMV. Модифицированные последовательности CPMV РНК включали либо «человеческий», либо «птичий» M2e, вставленный в ген, кодирующий белок S. Выход

рекомбинантного вируса составил 33 мкг/г биомассы листьев растений в случае СPMV/M2eh (M2e вирусов человека) и 15 мкг/г в случае СPMV/M2ea (M2e вирусов птиц). Электронно-микроскопический анализ химерных вирусных частиц показал, что введение эпитопов не влияет на сборку вирусных частиц и что частицы по морфологии и размерам схожи с частицами СPMV. Однако рекомбинантный вирус был нестабилен и возвращался к дикому типу, а системный транспорт был нарушен. Скорее всего, эти факторы объясняют низкий выход химерных частиц СPMV/M2e по сравнению с СPMV дикого типа, составлявшими до 1 мг/г зеленой массы [Meshcheriakova *et al.*, 2009].

Мышей вакцинировали подкожно три раза с интервалом в 3 недели 50 мкг рекомбинантных частиц СPMV, смешанных с неполным адьювантом Фрейнда. Было показано, что химерные частицы индуцируют выработку анти-M2e IgG. Иммунизация химерными частицами СPMV, несущими «человеческий» M2e, оказала умеренный защитный эффект против инфекции, вызванной 1xLD70 патогенного вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Выживаемость на 14-й день после заражения составила 33,3% в контрольной группе (иммунизированной wt/СPMV) и 66,6% в исследуемой группе. Защитный эффект СPMV/M2eh не наблюдался, когда иммунизированные мыши были заражены 1 LD90 вируса гриппа. Из-за нестабильности рекомбинантного вируса, низкого выхода и слабой иммуногенности эти химерные VLPs СPMV-M2e имеют ограниченный потенциал для развития в качестве кандидата на вакцину против гриппа.

*Вирусоподобные частицы, несущие M2e, образованные капсидным белком вируса мозаики альтернантеры (AltMV, Alternanthera Mosaic Virus)*

Перспективная система представления эпитопов на основе вируса мозаики альтернантеры (AltMV) была разработана группой И.Г. Атабекова (Московский государственный университет им М.В. Ломоносова) [Tyulkina *et al.*, 2011]. Как PVX, AltMV относится к роду *Potexvirus*. Его капсидный

белок способен собираться в VLPs в отсутствие вирусной геномной РНК и может использоваться в качестве носителя эпитопов.

Рекомбинантные белки оболочки AltMV были получены с использованием вектора экспрессии PVX-201 на основе генетических элементов X вируса картофеля (PVX). Этот вектор содержит полную копию кДНК генома PVX, клонированную между промотором 35S и терминатором Nos [Tyulkina *et al.*, 2011]. Два типа гибридных вирусных векторов, PVX-CP AltMV (вариант полного генома) и PVXdt-CP AltMV (вариант минирепликона, в котором отсутствует тройной генный блок транспортных белков PVX) использовались для экспрессии AltMV CP и его производных в растениях (рис. 1.4.1 D). В обоих векторах ген CP PVX был заменен на AltMV CP. Такая замена делает эту экспрессионную систему генетически безопасной, поскольку блокируется системный транспорт и образование инфекционных вирусных частиц. Пептид M2e и его более короткий усеченный вариант ( $\Delta$ M2e, EVETPIRN) были клонированы на С-конце CP AltMV, а химерные белки CP были экспрессировали в *N. benthamiana*. Никаких различий в накоплении химерных капсидных белков не наблюдалось для полноразмерного гибридного вирусного вектора или его минирепликонного варианта. Уровень накопления химерных капсидных белков AltMV (CP-M2e и CP- $\Delta$ M2e) в листьях растений был сопоставим с уровнем рекомбинантного CP AltMV и достигал 1 мг/г ткани листьев растений. Такой высокий уровень экспрессии редко достигается для немодельных белков в системах экспрессии растений [Lomonossoff and D'Aoust, 2016]. Химерные капсидные белки AltMV с эпитопами M2e образовали VLPs, аналогичные немодифицированным AltMV CP.

#### *Химерные вирионы вируса табачной мозаики, несущие M2e*

Коллектив И.Г. Атабекова также использовал вирус табачной мозаики (TMV, Tobacco mosaic virus) для презентации M2e пептида. Консенсусный эпитоп M2e человеческого гриппа был клонирован в ген CP штамма TMV U1

между кодонами 155 и 156, в результате был получен химерный вирус TMV-M2e (рис. 1.4.1 F) [Petukhova *et al.*, 2013; 2014]. Для улучшения растворимости белка гибридной оболочки два остатка цистеина в положениях 17 и 19 пептида M2e, ответственного за образование дисульфидных связей, были заменены остатками серина или аланина. После агрофилтрации листьев растения вирусы TMV-M2e-cys, TMV-M2e-ala и TMV-M2e-ser могли распространяться через сосудистую систему инфицированных *N. benthamiana*. Электронная микроскопия экстрактов из зараженных растений выявила палочковидные частицы, похожие на TMV. Было показано, что эпитоп M2e экспонируется на поверхности химерных вирионов.

Для оценки иммуногенности химерных вирионов мышей иммунизировали внутрибрюшинно 50 мкг частиц TMV-M2e-ser или TMVM2e-ala в неполном адьюванте Фрейнда трижды с двухнедельным интервалом. После первой иммунизации у мышей, иммунизированных TMV-M2e-ala, выявлялись более высокие титры анти-M2e IgG; однако после второй иммунизации уровни анти-M2e IgG, индуцированные TMV-M2e-ser и TMV-M2e-ala, статистически значимо не отличались.

Мыши, иммунизированные TMV-M2e-ser и TMV-M2e-ala, были заражены сублетальной (1xLD50) и летальной (5xLD50) дозой гомологичного вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) и дозой 5xLD50 гетерологичного вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1). Все мыши, иммунизированные TMVM2e-ser, выжили при 1xLD50 и 90% выжили при 5xLD50 гомологичного штамма гриппа. Испытание гомологичным штаммом гриппа у мышей, получавших TMV-M2e-ala, показало аналогичные результаты. Смертельная доза (5xLD50) гетерологичного вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1) привела только к частичной защите мышей (TMV-M2e-ser: выживаемость 46%; TMV-M2e-ala: выживаемость 70%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что химерный вирус TMV-M2e является перспективным кандидатом для разработки универсальной вакцины против гриппа.

#### *Присоединение M2e с частицами вируса мозаики папайи (PapMV, Papaya Mosaic Virus Particles)*

Другой подход для конструирования вирусных частиц, несущих пептид M2e, был разработан группой Denis Leclerc (Laval University, Canada). Белки оболочки вируса мозаики папайи (PapMV) способны самостоятельно собираться в палочкообразные частицы [Lebel *et al.*, 2016]. Частицы PapMV могут быть использованы для повышения иммуногенности присоединенных эпитопов [Leclerc *et al.*, 2014]. Было показано, что PapMV CP, несущий M2e на С-конце может быть экспрессирован в *Escherichia coli* и собирается в VLPs [Denis *et al.*, 2008]. Эти VLPs были иммуногенными у мышей, но значительные уровни титров антител против M2e и защиты от инфекции были получены только при многократной иммунизации и добавлении экзогенного адьюванта [Denis *et al.*, 2008; Carignan *et al.*, 2015]. Исследование, проведенное Carignan *et al.* [2015], показало, что присоединение короткого пептида, полученного из M2e (EVETPIRNE) к N-концу PapMV CP привело к получению высокостабильных и иммуногенных VLP, которые были способны индуцировать выработку антител против M2e и обеспечивать защиту от вируса гриппа. Однако присоединение более длинных пептидов к CP могло приводить нарушению образования VLP. Для решения этой проблемы Therien *et al.* [Thérien *et al.*, 2017] разработали новый подход, в котором эпитопы *in vitro* присоединялись к VLP, образованными PapMV CP. Метод основан на использовании бактериальной транспептидазы, которая может присоединять пептид к VLP, если сайт ее распознавания вставлен в CP. Этот подход позволил получить VLP, несущие полноразмерный пептид M2e. Эти частицы были способны индуцировать сильный иммунный ответ на M2e и защищали мышей от летальной дозы

вируса гриппа [Thérien *et al.*, 2017]. Хотя в этом исследовании PapMV CP был экспрессирован в *E. coli* и собран в VLP *in vitro*, аналогичный подход может быть использован в растениях и применен к другим вирусам растений.

#### *Другие носители M2e, экспрессируемые в растениях*

##### *Вирусоподобные частицы, образованные белком L1 вируса папилломы человека*

Белок L1 вируса папилломы человека (ВПЧ; HPV, Human papillomavirus) обладает способностью самособираться в высокоиммуногенные капсомеры или VLP, что может быть использовано для презентации M2e пептида [Matić *et al.*, 2011]. Синтетический ген HPV-16 L1 был использован группой Emanuela Noris (Istituto di Virologia Vegetale, Italy) в качестве основы для разработки химерных последовательностей, кодирующих либо полный M2e (2-24 аминокислоты), либо более короткую версию M2e, содержащую N-концевой эпитоп (M2e<sub>2-9</sub>) в двух прогнозируемых положениях на поверхности [Matić *et al.*, 2011]. Все химерные конструкции экспрессировали в растениях с помощью вектора pEAQ-HT (рис. 1.4.1 С) [Sainsbury *et al.*, 2009ab]. Гибридные белки были экспрессированы в *N. benthamiana* в количествах, достигающих 3,9% и 1,5% от общего растворимого белка для полноразмерного M2e. Два химерных белка, несущих более короткую версию эпитопа M2e, накапливались в меньших количествах. Электронно-микроскопический анализ показал, что химерные белки, образующиеся в растениях, спонтанно собираются в структуры более высокого порядка. Об иммуногенности или защитной эффективности этих белков в данном исследовании не сообщалось.

##### *Пептид M2e, присоединенный к Zera@ Tag*

Другой пример транзientной экспрессии M2e в растениях был описан группой Edward Rybicki из университета Кейптауна в Южной Африке [Mbewana *et al.*, 2015]. В этом исследовании пептид M2e был соединен с

сигнальным тагом, N-концевым доменом, богатым пролином, гамма-зеина кукурузы (Zera@, ERA Biotech), который нужен для образования белковых телец (рис. 1.4.1 Н). Такие таги могут быть использованы для защиты рекомбинантного белка от деградации внутри растительной клетки, что увеличило бы выход, облегчило бы очистку белка и повысило бы его иммуногенность [Torrent *et al.*, 2009; Whitehead *et al.*, 2014]. Белок M2e, соединенный с тагом Zera@, был транзientно экспрессирован в *N. benthamiana* с выходом 125-205 мкг/г. Четыре дозы 4,5 мкг Zera ® M2e без дополнительного адьюванта вводили внутримышечно мышам на 0, 14, 28 и 31-й дни. Было показано, что белок M2e с Zera@ tag, обладает высокой иммуногенностью у мышей, что указывает на потенциал этой экспрессионной системы для разработки недорогой универсальной вакцины против гриппа.

#### *Экспрессия M2e в трансгенных растениях ряски*

N-концевой фрагмент длиной 30 аа белка M2 вируса птичьего гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005(H5N1) экспрессировался [Firsov *et al.*, 2015] в трансформированных растениях ряски, *Lemna minor*. Последовательность M2e, соединенная в одной рамке с 5' концом гена  $\beta$ -глюкуронидазы, была клонирована в pVI121 под контролем промотора 35S (рис. 1.4.1 I). Полученную плазмиду использовали для генетической трансформации *L. minor*. Количественный ИФА экстрактов белковых препаратов показал, что целевое накопление белка колеблется от 0,09 до 0,97 мг/г веса растения [Firsov *et al.*, 2015]. Этот относительно высокий выход является перспективным для разработки экспрессионной системы на основе ряски для производства вакцин против гриппа, хотя  $\beta$ -глюкуронидаза не является подходящим носителем для повышения иммуногенности M2e.

Таким образом, M2e пептид является перспективным объектом для основы универсальной рекомбинантной растительной кандидатной вакцины против вируса гриппа А.



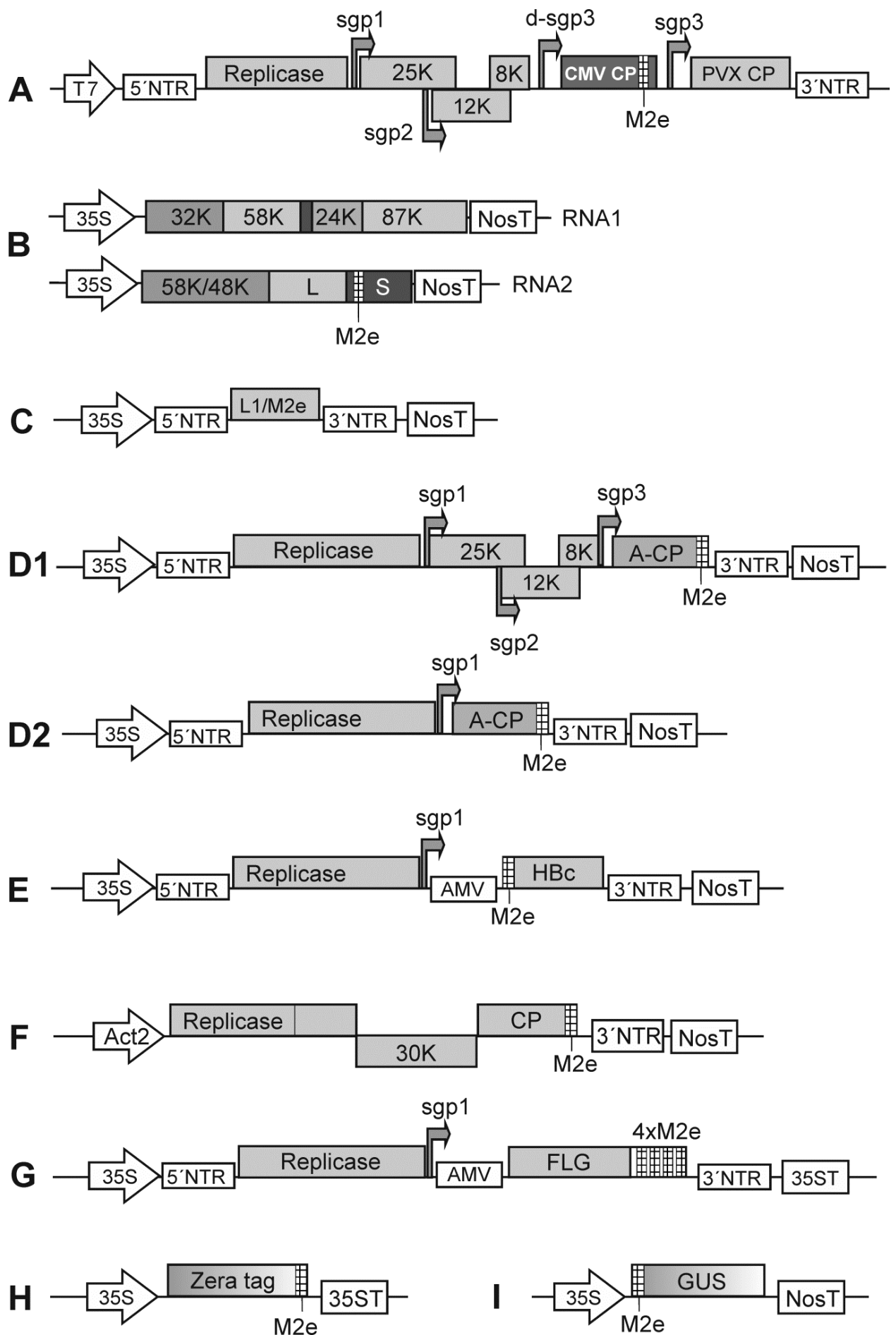


Рисунок 1.4.1. Схематическое представление экспрессионных кассет для продукции гибридных белков, содержащих M2e пептид, в растениях.

(А) M2e и CP CMV. (В) M2e и S белок оболочки CPMV. (С) M2e и HPV-16 L1 белок. (D) M2e и CP AltMV. Экспрессионные кассеты, представляющие полногеномный вариант и минирепликон вектора на основе PVX? Представлены на рисунке D1 и D2. (Е) M2e и HBc антиген. (F) M2e и CP TMV. (G) M2e и флагеллин. (H) M2e и Zera@ tag. (I) M2e и  $\beta$ -glucuronidase.

Сокращения: Replicase, РНК-зависимая РНК полимеразы PVX и TMV; T7, промотор для РНК полимеразы фага T7; 35S, промотор вирус мозаики цветной капусты; 35ST, терминатор вирус мозаики цветной капусты; Act 2, промотор транскрипции актина 2; NosT, терминатор нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; 5'NTR и 3'NTR, 5' и 3' нетранслируемые регионы вирусной РНК; AMV, лидерная последовательность РНК вируса мозаики люцерны; sgr, промотор субгеномной РНК PVX (d - дублицированный); A-CP, белок оболочки AltMV; PVX-CP, белок оболочки PVX; CMV-CP, белок оболочки CMV; FLG, флагеллин *S. typhimurium*; GUS,  $\beta$ - глюкуронидаза.

Рисунок из статьи [Mardanova *et al.*, 2018]. Панели E, G описаны в разделе результаты.

Таблица 1.4.1. Гибридные белки, содержащих M2e пептид, присоединенный к носителю при экспрессии в растениях

белок	M2e	носитель	растение	эффективность	ссылка
CMV CP-M2e	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	capsid protein (CP) of cucumber mosaic virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0.1% (6–8 µg/g)	Nemchinov <i>et al.</i> , 2007
CPMV CP-M2e	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	CP (S) of cowpea mosaic virus (CPMV)	<i>Cowpea California</i>	NR	Rasochova <i>et al.</i> , 2007
CPMV S-M2e	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (avian) SLLTEVETPIRNEWGSRNDSSD (human)	S-coat protein of CPMV	<i>Vigna unguiculata</i>	15 µg/g 33 µg/g	Meshcheriakova <i>et al.</i> , 2009
HPV L1-M2e	SLLTEVETPTRNEWECKCIDSSD SLLTEVET	Human papillomavirus 16 (HPV-16) L1 protein	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1.5–3.9% (45–120 µg/g)	Matic <i>et al.</i> , 2011
AltMV CP-M2e	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD EVETPIRN	CP of Alternanthera mosaic virus (AltMV)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1 mg/g	Tyulkina <i>et al.</i> , 2011
TMV CP-M2e	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (cys) SLLTEVETPIRNEWGSRNDSSD (cer) SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD (ala)	CP gene of tobacco mosaic virus (TMV)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	NR	Petukhova <i>et al.</i> , 2013, 2014
M2eGUS	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	β-glucuronidase	<i>Lemna minor</i>	0.12–1.96% (90–970 µg/g)	Firsov <i>et al.</i> , 2015
<b>Zera®M2e</b>	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	<b>Zera@ tag</b>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<b>125–205 µg/g</b>	<b>Mbewana <i>et al.</i>, 2009</b>

NR, нет данных

### 1.5. Флагеллин в качестве носителя M2e пептида вируса гриппа.

Флагеллин – бактериальный белок, участвующий в сборке жгутиков. Флагеллин обладает выраженными адьювантными свойствами, так как является лигандом TLR5 рецептора и через адаптерный белок MyD88 активирует клетки CD4<sup>+</sup> и дальнейшую индукцию синтеза специфических иммуноглобулинов. Еще одним преимуществом флагеллина как носителя является возможность введения гибридных белков на его основе интраназально.

Toll-подобный рецептор (TLRs, Toll-like receptors), играет решающую роль в управлении адаптивным иммунитетом, запускает важные регуляторные механизмы [Takeda *et al.*, 2003; Iwasaki *et al.*, 2004]. Было показано, что присоединение антигена к флагеллину путем создания «гибридного» гена генетическое, значительно повышает иммуногенность и протективность антигена. В одном исследовании гибридный белок, содержащий флагеллин с овалбумином, индуцировал выработку антител и CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ на овалбумин у мышей, в то время как сам овалбумин не вызывал иммунного ответа [Huleatt *et al.*, 2007]. В другой модельной системе к флагеллину была присоединена субъединица белка оболочки вируса Западного Нила. Полученная кандидатная вакцина индуцировала выработку нейтрализующих и защитных антител против вируса Западного Нила; при этом иммунизация антигеном вируса без флагеллина не вызвала сильного иммунного ответа [McDonald *et al.*, 2007]. Также была создана кандидатная вакцина против клещевого энцефалита на основе гибридного рекомбинантного белка, содержащего белок оболочки вируса клещевого энцефалита, присоединенный к флагеллину [Белавин и др., 2017].

Впервые стратегия присоединения M2e пептида к флагеллину была описана Huleatt *et al.* (2008), когда четыре тандемные копии консенсусной последовательности M2e на основе вирусов H1, H2 и H3 человека были генетически присоединены к флагеллину *Salmonella typhimurium*, и гибридный белок синтезировался в *E.coli*. Позднее был опубликован ряд

работ, в которых к флагеллину были присоединены различные антигены вируса гриппа. В таблице 1.5.1 представлены примеры таких гибридных белков.

Таблица 1.5.1. Примеры белков, содержащих флагеллин в качестве носителя и антигена вируса гриппа

№	Белок	Антиген	Экспрессионная система, ссылка	Способ введения вакцины	Заражение вирусом гриппа	Выживаемость животных
1	Flg-4M2e(hkhk)	SLLTEVETPIRNEWGCRC NDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Stepanova <i>et al.</i> , 2015  Tsybalova <i>et al.</i> , 2017	Интраназально	5LD50 A/PR/8/34(H1N1)	80%
		SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD (M2ek)			5LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	100%
					5LD50 A/Chicken/Kurgan/05/05 RG (H5N1)	90%
					10LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	75%
3	Flg-HA2-2-4M2e(hkhk)	SLLTEVETPIRNEWGCRC NDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Tsybalova <i>et al.</i> , 2017  Stepanova <i>et al.</i> , 2018 (1)	Интраназально	10LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	100%
		SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD (M2ek)			5LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	100%
4	Flg-4M2e(hkhk)-HA2-2	SLLTEVETPIRNEWGCRC NDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Stepanova <i>et al.</i> , 2018 (1)	Интраназально	5LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	87,5%
		SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD (M2ek)				
		RIQDLEKYVEDTKIDLWSY NAELLVALENQHTIDLTDS EMNKLFKTRRQLRENA (HA2-2)				
5	FlgSh/HA2-2-4M2e (hkhk)	SLLTEVETPIRNEWGCRC NDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Tsybalova <i>et al.</i> , 2017	Интраназально	10LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	75%
		SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD (M2ek)				
		RIQDLEKYVEDTKIDLWSY				

		NAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFKTRRQLRENA (HA2-2)				
6	Flg-4M2e(hshs)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Stepanova <i>et al.</i> , 2017	Интраназально	10LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	75%
		SLLTEVETPTRSEWECCRS DSSD (M2es)			10LD50 A/California/1/66(H2N2)	60%
					5LD50 A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)	70%
					10LD50 A/Aichi/2/68 (H3N2)	70%
					10LD50 A/California/1/66 (H2N2)	60%
					5LD50 A/Chicken/Kurgan/05/05 RG (H5N1)	40%
7	FlgSh/HA2-2-4M2e (hshs)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Stepanova <i>et al.</i> , 2017	Интраназально	10LD50 A/Aichi2/68(H3N2)	100%
		SLLTEVETPTRSEWECCRS DSSD (M2es)			5LD50 A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)	90%
		RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFKTRRQLRENA (HA2-2)			10LD50 A/California/1/66(H2N2)	100%
8	Flg-HA2-2-4M2e(hkhk)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Stepanova <i>et al.</i> , 2018 (2)	Подкожно	10LD50 A/Aichi/2/68 (H3N2)	100%
		SLLTEVETPTRNEWCCRS DSSD (M2ek)			Tsybalova <i>et al.</i> , 2018	A/Shanghai/2/2013-PR8-IDCDC (H3N2)
9	FlgSh/HA2-2-4M2e (hshs)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (M2eh)	<i>E.coli</i>  Stepanova <i>et al.</i> , 2018 (2)	Подкожно	10LD50 A/Aichi/2/68 (H3N2)	100%
		SLLTEVETPTRNEWCCRS DSSD (M2ek)			A/Shanghai/2/2013-PR8-IDCDC (H3N2)	100%
		RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFKTRRQLRENA				

		(HA2-2)				
10	Flg-HA2-1-4M2e(hkhk)	SLLTEVETPIRNEWGCRC NDSSD (M2eh)  SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD (M2ek)  RLENLNKKMEDGFLDVW TYNAELLVLMENERTLDF HDSNVKNLYDKVRMQLR DNA (HA2-1)	<i>E.coli</i>  Tsybalova <i>et al.</i> , 2018	Интраназально	10LD50 A/Aichi/2/68 (H3N2)  10LD50 A/California/1/66 (H2N2)  5LD50 A/Chicken/Kurgan/05/05 RG (H5N1)	80%  80%  70%
11	Flg-HA2-2-4M2e(hkhk)	SLLTEVETPIRNEWGCRC NDSSD (M2eh)  SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD (M2ek)  RIQDLEKYVEDTKIDLWSY NAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFKTRRQLRENA (HA2-2)	<i>E.coli</i>  Tsybalova <i>et al.</i> , 2018	Интраназально	10LD50 A/Aichi/2/68 (H3N2)  10LD50 A/California/1/66 (H2N2)  5LD50 A/Chicken/Kurgan/05/05 RG (H5N1)	100%  100%  90%
15	f4M2e nanoparticles	SLLTEVETPIRNEWGSRNS DSSD (M2eh)* SLLTEVETPTRSEWESRSS DSSD( H1N1 M2e) SLLTEVETPTRNEWESRSS DSSD (H5N1 M2e) SLLTEVETPTRTGWESNSS GSSE (H7N9 M2e)	<i>E.coli</i>  Deng <i>et al.</i> , 2017	Интраназально	4LD50 A/Aichi/2/68 (H3N2)	100%
16	f4M2e/fHAaichi nanoparticles	SLLTEVETPIRNEWGSRNS DSSD (M2eh)* SLLTEVETPTRSEWESRSS DSSD( H1N1 M2e) SLLTEVETPTRNEWESRSS DSSD (H5N1 M2e) SLLTEVETPTRTGWESNSS GSSE (H7N9 M2e)  H3 HA2 (24-184) A/Aichi/02/1968	<i>E.coli</i>  Deng <i>et al.</i> , 2017	интраназально	4LD50 A/Aichi/2/68 (H3N2)	100%
17	STF2.4xM2e	SLLTEVETPIRNEWGSRNS DSSD (M2eh)*	<i>E.coli</i>  Huleatt <i>et al.</i> , 2008	подкожно интраназально	1 LD90 A/PR8	до 90%  до 100%
18	HA1-2- <i>fliC</i>	HA1-2 (62-284) H7N9 A/chicken/Jiangsu/CZT4/2013	<i>E.coli</i>  Li 2015	внутрибрюшинно	-	-

1 9	tM2e/tFliC VLPs	SLLTEVETP IRNEWGCRCN D (M2eh)	Бакулови- русная система в клетках насекомых  Wang <i>et al.</i> , 2013	Интраназ ально	5LD50 A/Philippine/2/ 82 (H3N2)  5LD50 A/PR/8/34 (H1N1)	100%  100%
--------	--------------------	----------------------------------	--	-------------------	---	------------------

Таким образом, флагеллин является перспективным объектом для использования его в качестве носителя чужеродных пептидов при разработке кандидатных вакцинных препаратов с помощью экспрессии в растениях.



## 1.6. Вирус гепатита E

В 1981 г. академик РАМН М.С. Балаян обнаружил и описал вирус, ответственный за развитие гепатита E [Balayan *et al.*, 1983]. Инфекция, вызванная вирусом гепатита E (HEV, hepatitis E virus), в настоящее время является одной из наиболее частых причин острого гепатита в мире. Гепатит E в подавляющем большинстве случаев представляет собой самоограничивающееся острое заболевание, а в редких случаях острая инфекция может перерасти в хроническую, в первую очередь у лиц с ослабленным иммунитетом [Marion *et al.*, 2016]. Общая летальность составляет около 1% и достигает 30% среди беременных женщин в третьем триместре [Wu *et al.*, 2020].

HEV относится к семейству *Hepeviridae*, роду *Orthohepevirus*. Род *Orthohepevirus* включает четыре вида (от A до D) [Purdy *et al.*, 2017]. *Orthohepevirus A* заражает людей, свиней, кабанов, оленей, верблюдов, мангустов и кроликов. *Orthohepevirus B* заражает птиц, *Orthohepevirus C* содержит вирусы, заражающие крыс и хорьков, а *Orthohepevirus D* заражает летучих мышей [Smith *et al.*, 2018]. Существует восемь генотипов в пределах вида *Orthohepevirus A* (от HEV-1 до HEV-8), причем первые четыре обычно инфицируют людей. HEV-1 и HEV-2 инфицируют только людей и передаются фекально-оральным путем, в то время как HEV-3 и HEV-4 являются зоонозными и могут инфицировать как людей, так и животных [Primadharsini *et al.*, 2019]. HEV-3 является наиболее распространенным генотипом в Европе с тремя основными филогенетическими ветвями: HEV-3abjchi, HEV-3efg (обнаружен у людей, свиней, кабанов и оленей) и HEV-3ra (обнаружен у кроликов) [Smith *et al.*, 2016; Izopet *et al.*, 2012; Abravanel *et al.*, 2017; Oliveira-Filho *et al.*, 2014].

HEV представляет собой безоболочечный вирус диаметром 27–42 нм (рис. 1.6.1).

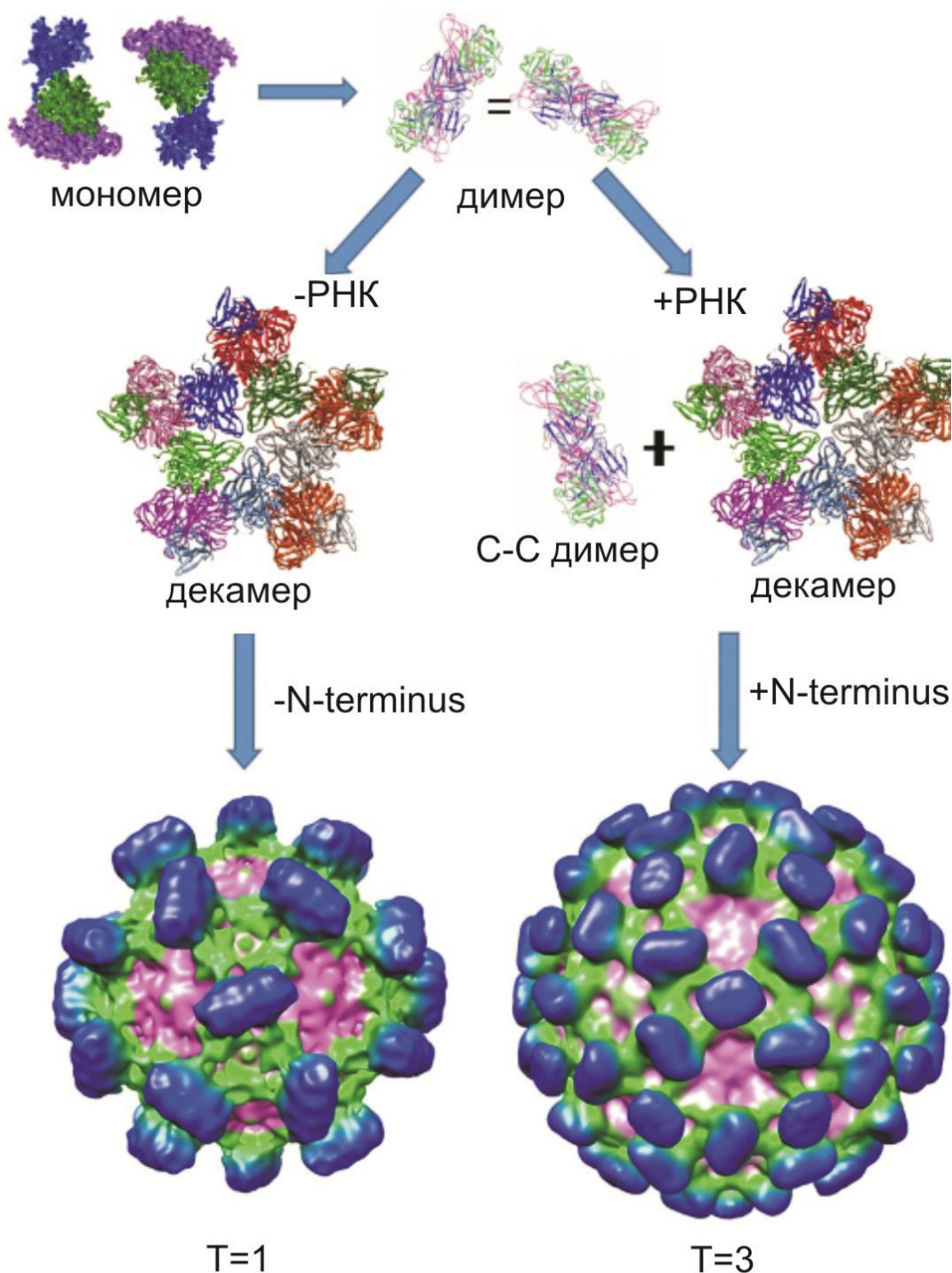


Рисунок 1.6.1. Диаграмма, показывающая предполагаемый процесс сборки HEV типа  $T = 1$  и вирионов типа  $T = 3$ . Капсидный белок кодирует информацию, которая необходима для сборки декамеров. Взаимодействие с фрагментом РНК приводит к образованию димеров С-С, которые направляют сборку полного  $T = 3$  икосаэдрического капсида [Liu *et al.*, 2011].

Геном вируса представляет собой одноцепочечную плюс РНК длиной около 7,2 – 7,8 тыс нт, на 5' конце которой находится 5' кэп, а 3' конец

содержит poly(A). РНК вируса содержит три открытые рамки считывания (ORF) [Tam *et al.*, 1991]. ORF1 кодирует вирусный неструктурный полипротеин (в состав которого входят метилтрансфераза, протеаза, хеликаза и РНК-зависимая РНК-полимераза) [Sehgal *et al.*, 2006], ORF2 кодирует вирусный капсидный белок [Jiménez de Oya *et al.*, 2012], а ORF3 кодирует небольшой регуляторный белок с множеством функций [Bradley *et al.*, 1988; Tyagi *et al.*, 2002] (рис. 1.6.2).

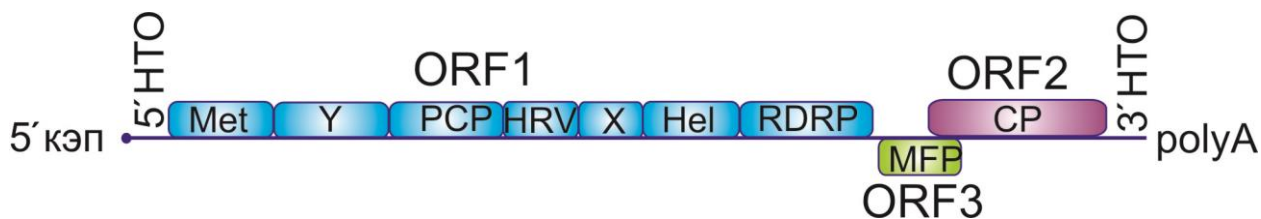


Рисунок 1.6.2. Схема строения генома вируса гепатита Е (HEV) и вирусных белков. Геном состоит из 5'-нетранслируемой области (5' РТО), трех открытых рамок считывания (ORF) и 3'-UTR. ORF1 составляет примерно 70% генома (5109 нт.) и кодирует неструктурные полипротеины, такие как метилтрансфераза (Met), Y-домен (Y), папаин-подобная цистеиновая протеаза (PCP), гипервариабельная область (HVR), макродомен (X), РНК-хеликаза (Hel) и РНК-зависимая РНК-полимераза (RDRP), которые необходимы для репликации. ORF2 и ORF3 частично перекрываются и транслируются с одной субгеномной РНК, которая имеет длину примерно 2,2 т.нт. ORF2 кодирует белок капсида вируса, который необходим для проникновения вируса в клетку, его сборки и иммуногенности. ORF3 кодирует небольшой многофункциональный фосфопротеин (MFP), который необходим для выхода вируса из клеток и, как предполагается, нарушает многочисленные клеточные пути [Parvez, 2017].

В настоящее время в основе вакцин от гепатита Е лежит использование капсидного белка ORF2, поскольку он содержит эпитопы, которые могут индуцировать образование вирус-нейтрализующих антител [Meng *et al.*, 2001; Emerson *et al.*, 2006].

Капсидный белок ORF2 также является подходящим кандидатом для серологического диагноза HEV [Mazalovska *et al.*, 2017]. Полноразмерный капсид HEV ORF2 белок состоит из 660 аминокислот с молекулярной массой 72 кДа. Белок включает сигнал локализации в эндоплазматическом

ретикулуме (ER) на N-конце, за которым следует богатая аргинином сигнальная последовательность, участвующая в инкапсуляции вирусной РНК [Meng *et al.*, 2008]. Капсидный белок складывается в три домена: S (оболочка; аминокислоты 112–319), М (средняя часть; аминокислоты 320–455) и Р (внешняя часть; аминокислоты 456–606) [Yamashita *et al.*, 2009]. S-домен собирается в стабильную икосаэдрическую оболочку, в то время как Р-домен выступает в виде поверхностного шипа и участвует во взаимодействиях с клеткой-хозяином и содержит нейтрализующие эпитопы [Guu *et al.*, 2009]. При экспрессии в животных клетках ORF2 гликозилирован (N-гликозилирование) по трем сайтам Asn 132, Asn 310 and Asn 562 [Jameel *et al.*, 1996; Torresi *et al.*, 1999; Zafrullah *et al.*, 1999].

Различные регионы ORF2 капсидного белка были экспрессированы в различных системах экспрессии, таких как *E. coli*, [Ge *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2014], дрожжи [Gupta *et al.*, 2020; Simanavicius *et al.*, 2018], клетки насекомых [Zhang *et al.*, 1997], клетки млекопитающих [Jameel *et al.*, 1996] и растения [Maloney *et al.*, 2004].

На данный момент разрабатывается более десятка кандидатных вакцин против гепатита E, три из которых достигли стадии клинических испытаний (Cao *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020). Одна рекомбинантная вакцина (Hecolin) одобрена для применения в Китае.

При экспрессии капсидного белка вируса гепатита E в клетках млекопитающих и насекомых наблюдались продукты ORF2 размером 53–88 кДа [Jameel *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997]. При экспрессии в клетках насекомых ORF2 продуцировал нерастворимый полноразмерный белок 72 кДа и растворимый вариант 56,5 кДа [McAtee *et al.*, 1996]. Дальнейшие исследования на различных линиях клеток насекомых показали получение растворимой формы продукта ORF2 с молекулярной массой 53 кДа, которая не содержит 111 аминокислот на N-конце и 52 аминокислот на C-конце ORF2. Способность формировать VLP с симметрией T = 1 сохранялась [Li *et al.*, 2005]. Рекомбинантные VLP HEV обладают сходной антигенностью и

поверхностной структурой с вирусом дикого типа и вызывают сильный иммунный ответ [Shrestha *et al.*, 2007]. Было показано, что рекомбинантный капсидный белок HEV, экспрессируемый в клетках насекомых, защищает приматов от острого гепатита E [Tsarev *et al.*, 1994], что указывает на возможность его использования для разработки рекомбинантной вакцины против HEV [Tsarev *et al.*, 1997].

Важным направлением исследований является тестирование домашних животных, свиней, на гепатит E, т.к. они являются источниками заражения людей. Диагностика инфекции HEV у свиней основана на обнаружении специфических антител IgM и IgG к HEV, а также РНК HEV.

На данный момент доступны коммерческие серологические диагностические тесты на HEV (PrioCHECK™ Porcine HEV Ab ELISA Kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species, Grabels, France). Эти тесты используют рекомбинантные капсидные белки генотипа 3, полученные дорогостоящими методами, что делает массовый скрининг распространения HEV среди животных финансово затратным. Разработка новых тест-систем является актуальной задачей.

Капсидный белок вируса гепатита E может быть использован в качестве вакцины от гепатита E и диагностикума данного заболевания, а также в качестве носителя пептидов других инфекций. Вставка чужеродных пептидов может осуществляться в два положения в области внешнего Р домена ORF2. Первое место вставки (Gly556) было выявлено на основании компьютерного моделирования [Avdjieva *et al.*, 2019]. Вторым вариантом (Tyr485) был использован в работе, в которой в ORF2 был клонирован фрагмент вируса иммунодефицита человека [Jariyarong *et al.*, 2013].

С помощью мутационного анализа были определены аминокислоты ORF2, с которыми происходит связывание антител против HEV [Yamashita *et al.*, 2009]. Сайт связывания антитела НЕР224 состоит из трех поверхностных петель вокруг остатка Tyr485 [Xing *et al.*, 2011]. При включении чужеродного эпитопа в этот сайт химерные частицы могут не индуцировать выработку

антител на носитель, что важно для его повторного использования при ревакцинации.

### 1.7. Коронавирус SARS-CoV-2.

В 2019 году началась наиболее серьезная пандемия за последние 100 лет. Заболевание COVID19, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2 начало стремительно распространяться по всему миру. Пандемия является большой проблемой в медико-социальной области, а также несет серьезные экономические последствия. Разработка эффективных диагностических систем и вакцинных препаратов является актуальной задачей.

Вирионы коронавирусов представляют собой сферические частицы диаметром 100–160 нм и содержат (+)ssRNA (кодирующую одноцепочечную РНК) размером более 27 т.нт. Геномная РНК имеет кэп-структуру на 5'-конце, поли-А структуру на 3'-конце.

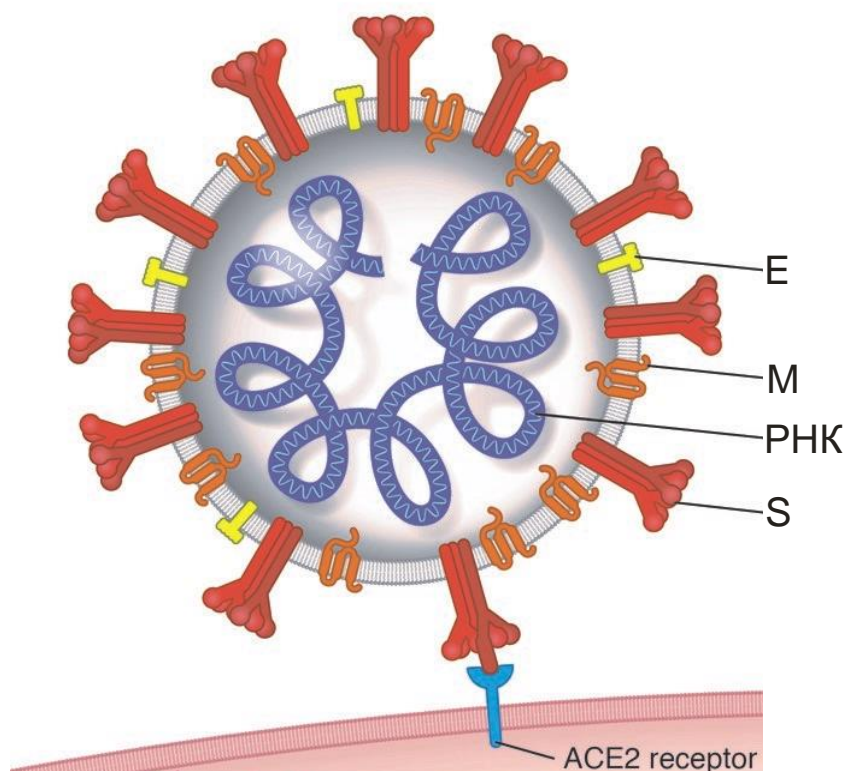


Рисунок 1.7.1. Строение коронавируса. S — белок Spike. E — белок оболочки. M — белок мембраны.

Две трети генома с 5'-конца кодируют белок pp1ab, который расщепляется на 16 неструктурных белков, участвующих в транскрипции и репликации генома. 3'-конец кодирует структурные белки.



IVDC-НВ-01/2019 (~29.8kb)

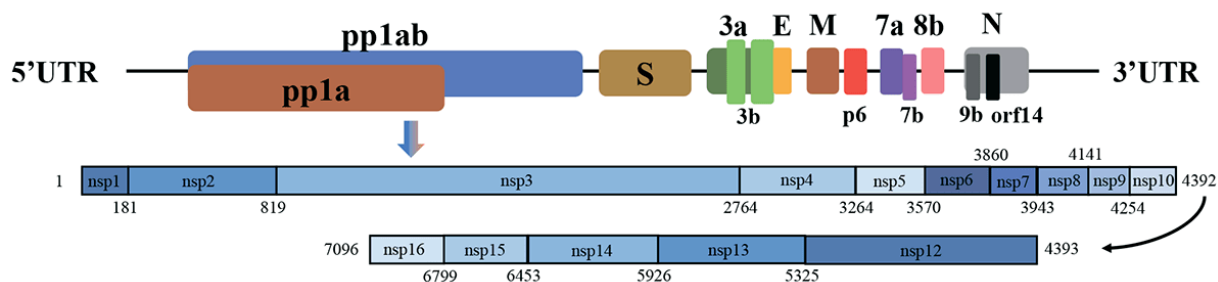


Рисунок 1.7.2. Геном вируса 2019-nCoV и кодируемые им белки. Белки pp1ab и pp1a — неструктурные, продукты их расщепления участвуют в транскрипции и трансляции вирусного генома. S — белок Spike. E — белок оболочки. M — белок мембраны. N — белки нуклеокапсида.

В настоящее время гликопротеин S и его укороченные варианты считаются лучшими кандидатами на создание рекомбинантных вакцин против SARS-Cov2 и диагностикумов.

S-белок образует тример на поверхности вирусной частицы и формирует вирусный шип (spike), который обеспечивает проникновение вируса в клетку (Рис. 1.7.3 и 1.7.4). Аминокислотная последовательность S-белка содержит сигнал для протеолитического расщепления на фрагменты S1 и S2, однако они остаются связанными за счёт нековалентных взаимодействий [Walls *et al.*, 2020]. Для проникновения в клетку хозяина S белок связывается с клеточным рецептором ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2) [Letko *et al.*, 2020; Watanabe *et al.*, 2020]. Две субъединицы S белка отвечают за связывание рецептора (субъединица S1) и слияние мембран (субъединица S2). В структуре S-белка, полученной методом криоэлектронной микроскопии [Wrapp *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020], можно выделить рецептор-связывающий домен RBD (receptor-binding domain, 319-541 aa), который связывается непосредственно с ACE-2 рецептором [Lan *et al.*, 2020], а также консервативный домен S2, который формирует ножку “шипа”, заякоривает белок в мембране вируса и обеспечивает слияние вирусной мембраны с мембраной клетки [Walls *et al.*, 2020].



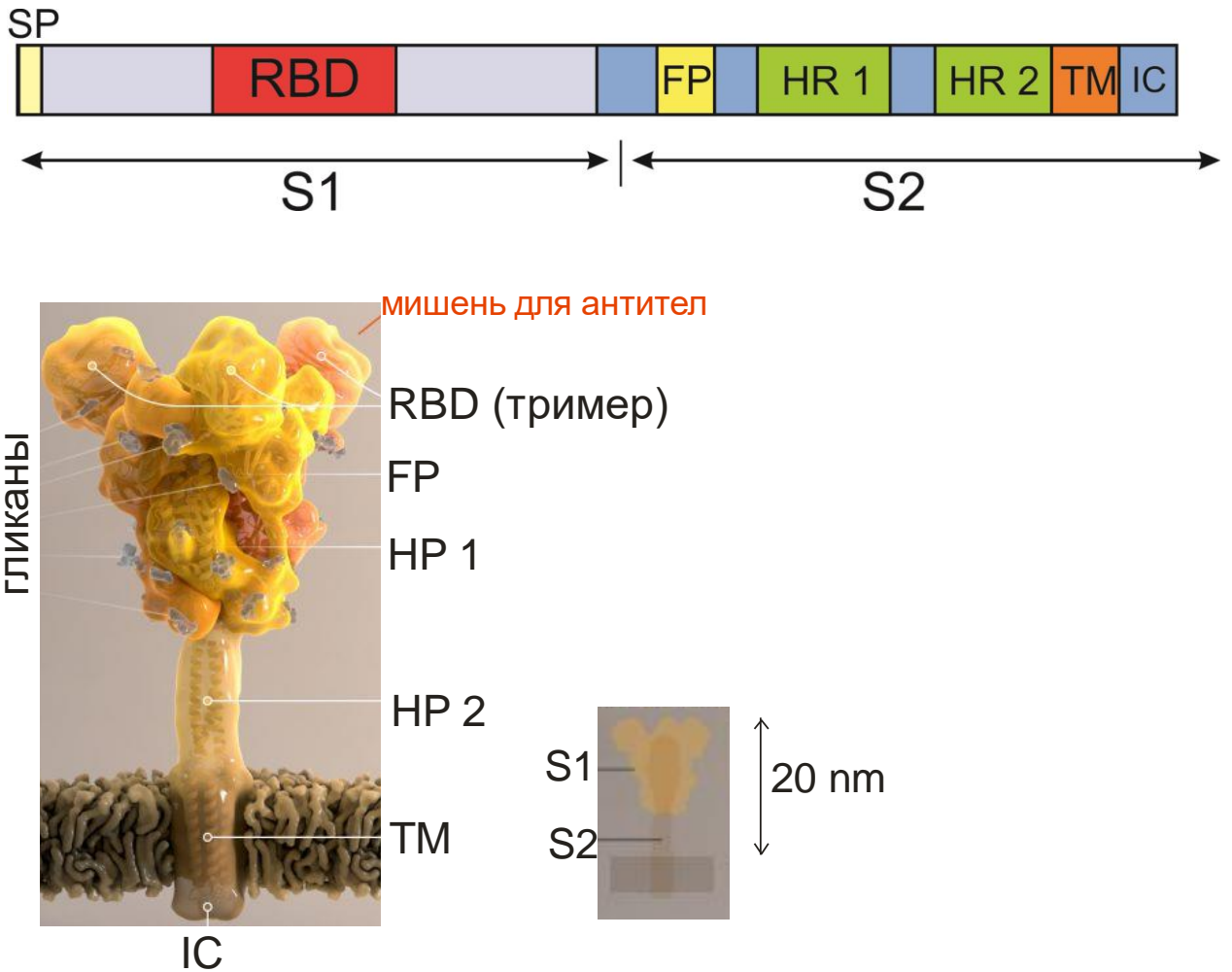


Рисунок 1.7.3. Пространственная структура S белка коронавируса. SP, сигнальный пептид, S1 и S2 – субъединицы S белка, FP, гибридный пептид; HR1, гептадный повтор 1; HR2, гептадный повтор 2; IC, внутриклеточный домен; TM, трансмембранный регион.

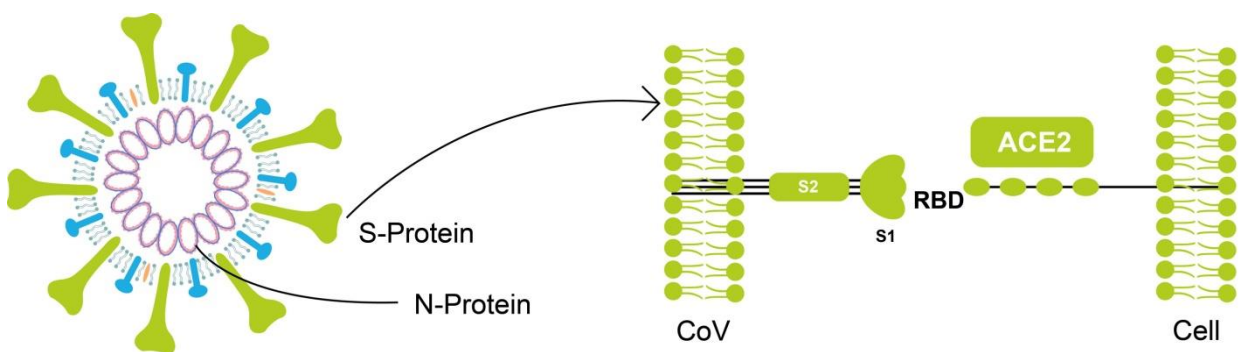


Рисунок 1.7.4. Схема связывания S-белка с ACE2 рецептором. S — белок Spike. S1 и S2 – субъединицы S белка. N — белки нуклеокапсида. ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2. CoV – коронавирус. RBD – рецептор-связывающий домен.

Было показано, что RBD является главным участком связывания нейтрализующих антител, выделенных из переболевших инфекцией пациентов. Ранее были разработаны кандидатные рекомбинантные вакцины против SARS-CoV и MERS-CoV на основе, как полноразмерного S-белка, так и его RBD домена [Coleman *et al.*, 2014; Ожаровская и др. 2019; Doremalen *et al.*, 2020; Volz *et al.*, 2015, Modjarrad *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2008; Nyon *et al.*, 2018].

Гликозилирование S-белка SARS-CoV-2 [Walls *et al.*, 2020] может экранировать пептидные эпитопы от распознавания антителами. В отличие от остального белка, RBD практически не гликозилирован, что связывают с необходимостью его взаимодействия с рецептором ACE2 (Watanabe *et al.*, 2020]. Результаты моделирования позволяют предположить, что поверхность S-белка, доступная для распознавания антителами, незначительно меняется при изменении типа олигосахаридов [Grant *et al.*, 2020]. Это, в свою очередь, открывает возможности для экспрессии S-белка и его гликозилированных производных в эукариотических экспрессионных системах, помимо клеток человека, в том числе и в растениях.

### *Экспрессия в растениях антигенов коронавируса*

В 2005 году была опубликована статья, в которой экспрессировали N-концевой фрагмент белка SARS-CoV S (S1) в томатах и растениях табака с низким содержанием никотина. Были получены трансгенные растения. S1 белок содержал сигнальную последовательность MIMASSKLLSL ALFLALLSHANS, последовательность шести гистидинов, а также HDEL последовательность локализации белка в эндоплазматическом ретикулуме. Было установлено, что полученный в растениях антиген индуцирует системный иммунный ответ и локальный иммунный ответ на слизистых оболочках у мышей. У мышей был значительно повышен уровень SARS-CoV-специфических IgA после перорального приема внутрь плодов томата, экспрессирующих белок S1. Сыворотки мышей парентерально

иммунизированных белком S1, полученным из табака, выявило наличие SARS-CoV-специфических IgG, обнаруженных с помощью вестерн-блоттинга и ELISA-анализ [Pogrebnyak *et al.*, 2005].

Экспрессия фрагментов S белка SARS-CoV-2 в растениях впервые опубликована в 2020 (Kaewta Rattanapisit *et al.*, 2020). В данной работе в растениях *N. benthamiana* с помощью транзientной экспрессии синтезировали рецептор связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2, а также анти-SARS-CoV моноклональные антитела (mAb) CR3022. RBD и mAb CR3022 экспрессировались с выходом до 8 мкг/г и 130 мкг/г свежего веса листьев, соответственно, на третий день после инфильтрации. RBD специфически связывался с рецептором SARS-CoV2, ангиотензин превращающим ферментом 2 (ACE2). Более того, mAb CR3022 растительного происхождения связывались с SARS-CoV2, но не мог нейтрализовать вирус *in vitro*. В работе использовался RBD фрагмент (GenBank accession number: YP\_009724390.1; F318-C617), который был оптимизирован по кодоновому составу для экспрессии в *N. benthamiana* и синтезирован *in vitro*. К RBD был присоединен 8XHis таг на С-конец, использовался вирусный вектор на основе геминивируса (pBY2e) [Kaewta Rattanapisit *et al.*, 2020].

Вслед за этой работой вышла вторая работа, в которой экспрессировались фрагменты S белка и нуклеокапсид SARS-CoV-2 [Mamedov *et al.*, 2020]. Очищенные варианты N и S белков, продуцируемые в растениях, распознавались специфическими моноклональными и поликлональными антителами. Иммунизация мышей белками, наработанными в растениях, вызывала высокие титры IgG антител. Ген, кодирующий белок нуклеокапсида (419 аа, GenBank YP\_009724397) и ген *rbd* (кодирует белок размером 319–591 аа, GenBank MN985325) с 6xhis или Flag тагом и домен S1 (14–815, GenBank MN985325) с 6xhis тагом были оптимизированы для экспрессии в *N. benthamiana* и синтезированы *in vitro*. Сигнальный пептид MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA для

направления в ЭР был добавлен на N-конец N, RBD и S1 белков. KDEL последовательность локализации в ЭР была присоединена к С-концу. Полученные последовательности клонировали в вектор pEAQ для экспрессии в растениях. Эффективность очистки RBD-His белка была менее 10 мг/кг биомассы листа, однако эффективность очистки RBD-FLAG была выше и составляла более 20 мг/кг биомассы листа [Mamedov *et al.*, 2020].

Различные исследовательские группы используют растительную систему экспрессии для получения полноразмерного S1 белка, RBD и VLP на основе белков SARS-CoV-2 в качестве кандидатных вакцинных препаратов [Mamedov *et al.*, 2023; Mamedov *et al.*, 2021; Royal *et al.*, 2021; Moon *et al.*, 2022; O'Kennedy *et al.*, 2023; Diego-Martin *et al.*, 2020; Shin *et al.*, 2021; Maharjan *et al.*, 2021]. Некоторые препараты находятся на стадии клинических и доклинических испытаний [Gobeil *et al.*, 2021; Ward *et al.*, 2021; Hager *et al.*, 2022; Pillet *et al.*, 2022; Ruocco and Strasser, 2022]. Препараты, полученные в растениях, продемонстрировали свою безопасность [Gobeil *et al.*, 2021; Ward *et al.*, 2021; Hager *et al.*, 2022; Pillet *et al.*, 2022]. Вакцина, представляющая собой VLP на основе полноразмерного S белка, была одобрена для применения в Канаде (Medicago).

## 2. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ

Целью работы является разработка методов экспрессии рекомбинантных белков в растениях, основанных на использовании самореплицирующихся фитовирусных векторов, и их применение для продукции в растениях вакцинных белков возбудителей социально-значимых инфекционных заболеваний.

При этом были поставлены следующие задачи:

1. Создание векторов на основе генома X вируса картофеля для транзientной экспрессии рекомбинантных белков в растениях *Nicotiana benthamiana*.
2. Разработка кандидатной «растительной» вакцины от вируса гриппа А на основе вирусоподобных частиц, образуемых ядерным антигеном вируса гепатита В и несущих M2e пептид вируса гриппа.
3. Разработка кандидатной «растительной» вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида, присоединенного к бактериальному флагеллину.
4. Разработка кандидатной «растительной» вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида и фрагмента гемагглютинаина, присоединенных к бактериальному флагеллину.
5. Экспрессия в растениях вирусоподобных частиц, образуемых капсидным белком вируса гепатита Е, а также модифицированных частиц - носителей M2e пептида вируса гриппа А и рецептор-связывающего домена белка S коронавируса SARS-CoV-2.
6. Экспрессия в растениях антигенов коронавируса SARS-Cov-2.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### *Бактериальные штаммы, среды и реагенты*

Бактерии *Escherichia coli* (DH10B, Grant *et al.*, 1990) выращивали в LB-бульоне или на чашках с LB агаром при 37 °С. Агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) выращивали при 28 °С. При необходимости в среды добавляли антибиотики: ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (50 мкг/мл), рифампицин (50 мкг/мл) или гентамицин (25 мкг/мл).

#### *Трансформация E. coli*

Для трансформации использовали стандартную методику [Sambrook *et al.*, 1989] со следующей модификацией: вместо буфера TFB использовали буфер следующего состава: CaCl<sub>2</sub> 50 mM, KCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 10 mM, HEPES 10 mM, pH 6.3.

#### *Трансформация агробактерий*

При трансформации агробактерий было использовано две методики. Для трансформации агробактерий векторами на основе pA7248 использовали методику конъюгативного переноса с хелперной плазмидой RK2013(Km), для трансформации агробактерий векторами на основе pEff использовали электропорацию.

#### *Получение рекомбинантных векторов*

- *pA7248AMV*

В качестве основы для создания вектора pA7248AMV (с трансляционным энхансером AMV) был использован вектор на основе генома X вируса картофеля pA7248 (PVXdt\_GFP) [Комарова и др. 2006], основанный на геноме ХВК штамма UK3 (GenBank M95516). В вектор вводили уникальные сайты рестрикции *AscI* и *SmaI* для клонирования генов.

Для этого были осуществлены следующие генно-инженерные манипуляции, в результате которых получен вектор pA7248T, кодирующий ген устойчивости к тетрациклину, фланкированный двумя уникальными сайтами рестрикции *AscI* (GGCGCGCC) и *SmaI* (CCCGGG):

(i) Амплификация гена устойчивости к тетрациклину с использованием праймеров TetXAsc и TetBSma. В качестве матрицы была использована плазида pKRP12 [Kimberly et al., 1995]. Полученный ПЦР-фрагмент был клонирован в вектор pGEM (Promega, USA). В результате был получен вектор pGEM-tet.

(ii) В плазмиде pA7231 ген *gfp* заменяли на ген устойчивости к тетрациклину с использованием сайтов рестрикции *XbaI* / *BsrGI*. В результате была получена плазида pA7231T.

(iii) Из плазмиды pA7231T вырезали фрагмент *BlnI* / *SacI* и заменяли им *BlnI* / *SacI* фрагмент плазмиды pA7248, содержащий ген *gfp*. В результате была получена плазида pA7248T.

Для создания вектора pA7248AMVT, содержащего трансляционный энхансер AMV (TTTTTATTTTТААТТТТСТТТCAAАТАСТТССАТСА), на основе вектора pA7248T осуществляли следующие генно-инженерные манипуляции:

(i) Ген устойчивости к тетрациклину (*tet*) из плазмиды pKRP12 амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров TetAMV (последовательность AMV включена в праймер) и TetBSma, полученный фрагмент клонировали в векторе pGEMT. В результате была получена плазида pGEM-amvtet.

(ii) Из плазмиды pA7231 вырезали ген *gfp* по сайтам *XbaI* / *BsrGI*, и клонировали на его месте ген *tet* с последовательностью AMV, вырезанный из pGEM-tet по сайтам *XbaI* / *BsrGI*. В результате была получена плазида pA7231T.

(iii) Из плазмиды pA7231T вырезали фрагмент *BlnI* / *SacI* и заменяли им *BlnI* / *SacI* фрагмент плазмиды pA7248, содержащий ген *gfp*. В результате была получена плазида pA7248amvT.

Сконструированный на этом этапе работы вектор pA7248AMVT дает возможность осуществлять клонирование целевого гена в один этап, с использованием уникальных сайтов узнавания рестриктаз *AscI* (GGCGCGCC) и *SmaI* (CCCGGG).

- *pEff-GFP*

В качестве основы для создания вектора pEff был использован вектор pEAQselectK (GenBank: GQ497231.1). Этот вектор представляет собой укороченный вектор pBINPLUS [Saisbury 2009]. Для дальнейшего клонирования на первом этапе в векторе pEAQselectK удаляли сайты рестрикции *AscI* и *SmaI*. Для этого плазмиду pEAQselectK обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *AscI* и *SmaI*, затем достраивали концы с помощью фрагмента Кленова и замыкали фрагмент в кольцо лигированием. В результате получили вектор pEf.

В вектор pEf была клонирована кассета экспрессии из вектора pA7248AMV, включающая 35S промотор, 5'-НТО генома ХВК, ген вирусной РНК-полимеразы, субгеномный промотор гена транспортного белка 25К ХВК, трансляционный энхансер из вируса мозаики люцерны (AMV), ген *gfp*, 3'-НТО ХВК, NOS-T терминатор. Вставку получали с помощью ПЦР с использованием праймеров XhoI\_35S\_F и Nos-T\_Bst1107I\_R и клонировали по сайтам рестрикции XhoI и Bst1107I.

Нуклеотидная последовательность гена супрессора сайленсинга p24 была оптимизирована *in silico* для экспрессии в клетках растений *Nicotiana benthamiana* и синтезирована *in vitro* (Евроген, Россия).

Синтетическая последовательность гена p24 была клонирована в вектор pNRGFP [Mardanova 2007] вместо *gfp* по сайтам *BamHI* и *BsrGI*. pNRGFP представляет собой бинарный вектор, содержащий кассету



экспрессии 35S-промотор—*gfp*—Nos-T. Затем последовательность 35S—p24—Nos-T была амплифицирована с помощью ПЦР с использованием праймеров *BlnI\_35S\_F*, *Nos-T\_SnaBI\_R* и клонирована в pEAQselectK по сайтам *BlnI*, *SnaBI*. В результате был получен вектор pEf-p24.

Аналогичный вектор pEf-p19, содержащий ген супрессора p19 вместо p24, был получен в результате замены гена p24 в pEf-p24. Последовательность гена p19 получали с помощью ПЦР, в качестве матрицы использовали pEAQspecialK-GFP-НТ [Saisbury 2009] (праймеры: P19-B<sup>NI</sup>, P19-Sw<sup>I</sup>-R). Клонирование осуществляли по сайтам *Bam*HI и *Swa*I.

На следующем этапе кассету экспрессии супрессора p24 клонировали в полученный ранее pEf-GFP вектор по сайтам *BlnI*, *SnaBI*. В результате был получен вектор pEff-GFP.

- *pEff-SP*

Последовательность синтетического гена была спроектирована таким образом, чтобы она кодировала гибридный белок следующей структуры:

*SP\_synth*: *AscI*- SP-6His-gggsg-*ClaI*-at-*SmaI*:

1. MIMASSKLLSLALFLALLSHANS, сигнальный пептид (SP) из *Phaseolus vulgaris* для направления белка в эндоплазматический ретикулум:  
ATG ATT ATG GCA AGC AGT AAG CTG CTG TCA CTG GCT CTC TTC  
CTT GCA CTC CTG AGT CAT GCT AAC AGC;
2. Сигнал удержания в эндоплазматическом ретикулуме HDEL (CAT  
GAC GAG CTG (*N. benthamiana*));
3. Эндонуклеазы рестрикции: *AscI* (GGCGCGCC), *ClaI* (ATCGAT), *SmaI*  
(CCCGGG);
4. 6-гистидиновый таг (CAT CAC CAT CAC CAT CAT);
5. Линкер GGGSG (GGA GGT GGT TCT GGA).

Синтетическая последовательность была клонирована в векторе pEff с использованием сайтов *AscI* и *SmaI*. В результате был получен вектор pEff-SP.

- *pUEff*

На следующем этапе в векторе pEff-SP был клонирован ПЦР-фрагмент, кодирующий последовательность: *ClaI-NruI-SacI-RBD\_319-524-XmaI-HDEL-taa-StuI*. Также в данном векторе имеется последовательность HDEL (CAT GAC GAG CTG), адаптированная по кодоновому составу для растений *N. benthamiana*.

В качестве целевого гена был использована последовательность, кодирующая фрагмент RBD (Receptor Binding Domain, 319 – 524 аа, вируса SARS-Cov-2). В качестве матрицы использовали кДНК S белка вируса SARS-Cov-2 (праймеры F\_RBD\_Cla-Nru-Sac и R\_RBD\_Sma-HDEL-stop-Stu). ПЦР-фрагмент, обработанный эндонуклеазами рестрикции *ClaI* / *StuI* клонировали в вектор pEff-SP, обработанный эндонуклеазами рестрикции *ClaI* / *SmaI*. В результате был получен универсальный экспрессионный вектор pUEff.

- *pAEff*

Вектор pAEff (Advanced Effective vector) отличается от pUEff последовательностью, кодирующей 8 гистидиновый таг, расположенный на С-конце целевого белка. Последовательность 8 гистидинового тага была отделена от HDEL последовательностью GSS линкера. Для получения данного вектора последовательность, кодирующую *AscI* – сигнальный пептид – *ClaI* – *NruI* – *SacI* – GSGS линкер – целевой ген (последовательность рецептор-связывающего домена, RBD (319-541 аа) S1 белка вируса SARS-CoV-2 штамм Delta, GenBank QZC92021.1) – *XmaI* – 8 гистидинов – GGS линкер – HDEL – стоп-кодон, UAA – *StuI* синтезировали *in vitro* (Евроген, Россия) (RBD<sub>delta</sub>\_synth). *ClaI* / *StuI* фрагмент клонировали в вектор pEff-SP, обработанный эндонуклеазами рестрикции *ClaI* / *SmaI*.

- pA7248AMV-Hbc

Последовательность НВс была адаптирована для экспрессии в *N. benthamiana in silico* (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>) и синтезирована *in vitro* (Евроген). Синтезированная последовательность содержала сайты *AscI* / *SmaI* и была клонирована в векторе pA7248AMV.

- *pA7248AMV-M2epHbc*

Искусственный ген M2epHbc, кодирующий гибридный белок, содержащий M2e пептид вируса гриппа А на N-конце НВс антигена, был синтезирован *in vitro* (Евроген) в составе плазмиды pGEM-T. Нуклеотидная последовательность гена была оптимизирована *in silico* для экспрессии в *N. benthamiana*.

Ген, кодирующий целевой белок, клонировали в pA7248GFP по сайтам *AscI* и *SmaI*, в результате чего был получен вектор pA7248AMV-M2epHbc.

- *pEff-M2epHbc*

Рекомбинантный вектор pEff-M2eHbc был сконструирован для экспрессии гибридного белка M2eHbc, состоящего из внеклеточного домена белка M2 (M2e) вируса гриппа А / Duck / Potsdam / 1402-6 / 1986 и ядерного антигена гепатита В (Hbc). Оптимизированный для растений синтетический ген M2eHbc был вырезан из вектора pA7248amv-M2epHbc и клонирован в вектор pEff с использованием сайтов рестрикции *AscI* и *SmaI*.

- *pEff-HEV*

Гены, включающие ORF2 HEV клонировали в вектор pEff-GFP по сайтам *AscI* и *SmaI* вместо гена *gfp*.

Последовательность ORF2 HEV (110-610 aa) с последовательностью M2e (в положении Gly556) и без нее получали с помощью ПЦР. В качестве матриц использовали векторы pEAQ-HEV/M2e и pEAQ-HEV, предоставленные нам д-ром Gergana Zahmanova (Университет Пловдива, Болгария). Для ПЦР использовали праймеры HEV110\_Asc-F и HEV\_Sma-R.

ПЦР-фрагменты клонировали в векторе pGEM-TEasy (Promega). Затем вставки вырезали и клонировали в векторе pEff по сайтам *AscI* и *SmaI*. В результате было получено два рекомбинантных экспрессионных вектора: pEff-HEV110-610 и pEff-M2 HEV110-610.

Последовательность 6 гистидинового тага вводили с помощью ПЦР. Для этого вместо праймера HEV\_Sma-R использовали праймер HEV-his\_R.

Вектор pEff\_HEV110-610/M2e(485), включающий последовательность M2e в положении Tyr485 капсида HEV получали в несколько этапов. На первом этапе сайты эндонуклеаз *XhoI* и *SnaI* были введены в HEV 110-610 с помощью ПЦР с использованием праймеров F\_HEV\_485\_Sna/Xho и R\_HEV\_485\_Xho. В качестве матрицы использовалась плазмида, содержащая ген HEV 110-610 и 6- his на С-конце в векторе pGEM (Promega, США). Полученная плазмида была названа pGEM-HEV110-610\_XhoI/SnaI. Последовательность M2e, фланкированная линкерами GGGSG на N- и С-конце, была амплифицирована методом ПЦР с использованием праймеров M2eh\_GS\_Sho\_F и M2eh\_GS\_Sna\_R и вектора pEff-M2 HEV110-610 в качестве матрицы. Фрагменты ПЦР содержали сайты рестрикции *XhoI* и *SnaI*, которые использовались для клонирования фрагмента ПЦР в вектор pGEM-HEV 110-610\_XhoI/SnaI, обработанный теми же ферментами. Гибридный ген HEV 110-610/M2e(485) был клонирован в вектор pEff по сайтам *AscI* и *SmaI*.

- *pEff-RBD*

Были использованы три варианта последовательностей: полноразмерный белок S1 (начиная с 15 aa), RBD (319-541 aa) и укороченный вариант RBD (319-524 aa). Использовали последовательность S1 белка вируса SARS-Cov2 (изолят Wuhan-Hu-1, GenBank: QJE37812.1).

Последовательности генов были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием пар праймеров, представленных ниже. В качестве матрицы использовали плазмиду, содержащую последовательность кДНК S белка вируса SARS-Cov2.

## Пары праймеров для ПЦР фрагментов SARS-CoV-2

Фрагмент ПЦР	Праймер F	Праймер R
PCR1	F_319_ClaI	R_524_HDEL STOP_XmaI
PCR2	F_319_ClaI	R_541_HDEL STOP_XmaI
PCR3	F_15_ClaI	R_1210_HDEL STOP_XmaI
PCR4	F_319_AscI	R_524_6his STOP_XmaI
PCR5	F_319_AscI	R_541_6his STOP_XmaI

ПЦР-фрагменты клонировали в вектор pGEM-T. Полученные вставки секвенировали, после чего клонировали в экспрессионные векторы. Клонирование осуществляли по сайтам рестрикции *AscI* и *XmaI* или *ClaI* и *XmaI*. Фрагменты PCR1, PCR2, PCR3 клонировали в вектор pEff-SP, фрагменты PCR2 и PCR3 клонировали в вектор pEff-GFP.

### *Агроинфильтрация растений*

Растения *N. benthamiana* выращивали в теплице при 16-часовом дневном режиме с дополнительным освещением фитолампами полного спектра до появления 5–6 настоящих листьев.

Агробактерии, содержавшие рекомбинантные бинарные векторы, выращивали в течение суток на шейкере при 28 °С. Клетки агробактерий осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин), осадок ресуспендировали в буфере, содержавшего 10 mM Mes (pH 5,5) и 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Листья растений *N. benthamiana* инъецировали суспензией агробактерий (оптическое поглощение раствора OD<sub>600</sub> = 0,2) с помощью шприца без иглы либо с помощью вакуумной инфильтрации.

Для вакуумной инфильтрации растение опускали в раствор с суспензией агробактерий, помещали в эксикатор, создавали разрежение воздуха с помощью вакуумного насоса (KIF LAB LABOPORT, US)

продолжительностью 1 минуту, затем медленно впускали воздух. Разрежение создавали от 200 мБар до 400 мБар. Процедуру повторяли дважды.

#### *Выделение белков из растительной ткани*

Для небольших экспериментов кусочки листьев из агроинфильтрованных зон (~ 10 мг) вырезали и гомогенизировали в 50 мкл экстракционного буфера (0,4 мМ сахарозы, 50 мМ Трис, pH 8,0, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10% глицерина, 5 мМ бета-меркаптоэтанола). Полученную суспензию центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли равный объем буфера для нанесения на электрофорез (20% глицерина, 5% SDS, 62,5 мМ Трис, pH 6,8, 0,5% бромфенолового синего, 5% β-меркаптоэтанола). Концентрации белков определяли методом Брэдфорд или с помощью набора Qubit Protein AssayKit на Qubit Fluorometer (Invitrogen). Полученные белковые препараты анализировали с помощью SDS-PAGE в акриламидном геле и вестерн-блоттинга.

#### *Очистка рекомбинантных белков с помощью металл-аффинной хроматографии*

Для очистки белковых препаратов с помощью металл-аффинной хроматографии в нативных условиях с растений отрезали листья, к ним добавляли экстракционный буфер (50 мМ Na-фосфатный буфер, 300 мМ NaCl, pH 8.0) в расчете 5 мл на 1 г листьев. Листья гомогенизировали, затем полученную смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут, отбирали супернатант. Супернатант инкубировали со смолой Ni-NTA (QIAGEN), уравновешенной тем же буфером, в течение 60 минут. Затем смолу дважды промывали с буфером, содержащим 10 мМ имидазол и 20 мМ имидазол, соответственно. Рекомбинантные белки элюировали с помощью буфера, содержащего 500 мМ имидазол.

Для очистки белковых препаратов с помощью металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях с растений отрезали листья, к ним добавляли денатурирующий буфер (6М Guanidine-HCl, 50 mM Na-фосфатный буфер, 300 mM NaCl, pH 8.0) в расчете 5 мл на 1 г листьев. Листья гомогенизировали, затем полученную смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут, отбирали супернатант. Супернатант инкубировали со смолой Ni-NTA (QIAGEN), уравновешенной тем же буфером, в течение 60 минут. Затем смолу дважды промывали с буфером, содержащим 10 mM имидазол и 20 mM имидазол, соответственно. Для промывки были использованы два варианта буферов:

А. 50 mM Na-фосфатный буфер, 300 mM NaCl, pH 8.0;

В. 8М мочевины, 50 mM Na-фосфатный буфер, 300 mM NaCl, pH 8.0.

Рекомбинантные белки элюировали с помощью буфера (А или В), содержащего 500 mM имидазол.

Полученные белки диализовали против буфера (50 mM Na-фосфатный буфер, 300 mM NaCl, pH 8.0) с помощью Slide-A-Lyzer Mini dialysis devices (Thermo Fisher Scientific, USA). После диализа некоторые белки дополнительно очищали с помощью фильтра 0,22  $\mu$ m Sprintzen/Syringe-Filter (TPP, Great Britain).

#### *Очистка вирусоподобных частиц на основе НВс антигена*

Вирусоподобные М2ерНВс частицы выделяли из растительной ткани методом осаждения сульфатом аммония. Для этого к раствору белков, выделенных из листьев растений – продуцентов, добавляли 1/2 объема насыщенного раствора сульфата аммония, перемешивали и оставляли на 60 мин при 4°. Белки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 13 000 g. Образовавшийся после центрифугирования осадок белков растворяли в 1 мл буфера, содержавшего 50 mM Tris HCl с pH 8,0, 0,5М NaCl, 15 mM ЭДТА и 20% сахарозы. Затем процедуру осаждения сульфатом аммония повторяли еще раз, окончательно препарат растворяли в 50 mM Tris HCl с pH

8,0, содержавшего 0,5М NaCl, 15 мМ ЭДТА и 20% сахарозы (до концентрации 5 мг/мл) и хранили при  $-20^{\circ}$ . На этой стадии доля целевого белка M2eHBc в препарате составляла ~15%.

Дополнительную очистку частиц проводили с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы и хлористого цезия [Cellar *et al.*, 2008]. Образец наносили на градиент и центрифугировали в течение 20 ч при 26 000 об/мин (центрифуга Avanti J 30 I, ротор SW41, «Beckman Coulter», США). Отобранные после центрифугирования фракции градиента диализовали против буфера STE (pH 8,0) в течение 48 ч с помощью набора Mini Dialysis Kit («GE Healthcare») и исследовали на наличие целевого белка M2eHBc с помощью SDS-PAGE в 12% геле и Вестерн блоттинга. Затем объединяли фракции, содержавшие M2eHBc. Степень очистки целевого белка составила не менее 90%.

Вирусоподобные частицы, образованные белком M2eHBc, выделяли из препаратов растворимого белка также с помощью метода, подробно описанного в работе Peuret и др. (2015). Через 7 суток после заражения инфильтрированную растительную ткань смешивали с тремя объемами 0,1 М фосфата натрия (pH 7,2), фильтровали через miracloth и центрифугировали. Супернатант фильтровали с использованием шприцевого фильтра 0,45  $\mu$ m, затем ультрацентрифугировали через двойную подушку из сахарозы. Частицы собирали со дна сахарозной подушки, диализовали против PBS, затем ультрацентрифугировали в градиенте плотности с Nycodenz.

#### *Анализ экспрессии гена gfp в N. benthamiana*

Визуализацию синтеза зеленого флуоресцентного белка осуществляли, освещая лист ультрафиолетом или анализировали уровень флуоресценции белка в суммарных растворимых белковых препаратах с помощью прибора Флюорат 02 Панорама (ЛЮМЭКС, Россия) согласно инструкции производителя.



### *Вестерн блоттинг*

Электрофорез белков проводили в ПААГ (10%) в присутствии SDS. Перенос белков из геля на мембрану Hybond-P («GE Healthcare», США) осуществляли методом электроблоттинга. Для исключения неспецифического связывания антител с мембраной последнюю обрабатывали 5% раствором сухого молока в буфере TBS-T (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис, 0,1% Твин 20, pH 8,0).

После этого мембрану инкубировали с первичными антителами, а затем проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (1 час обработка, 3 x 15 мин отмывка). Детекцию специфических белковых комплексов проводили с использованием набора Western Blott ECL Plus (GE Healthcare»). Детекцию осуществляли с помощью рентгеновской пленки или систем визуализации вестерн-блотов ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden), Fusion Solo X (Vilber, Germany).

### *Антитела*

первичные антитела:

1. мышинные антитела к пептиду M2e (Anti-Influenza A Virus M2 Protein antibody [14C2] (ab5416); Abcam);
2. мышинные антитела к белку HEV ORF2 (предоставлены НИИ гриппа);
3. мышинные антитела к белку Flg (предоставлены НИИ гриппа);
4. мышинные моноклональные антитела к M2e пептиду G19 (предоставлены П.Г. Свешниковым, ОАО "ВНЦМДЛ").

вторичные антитела:

1. кроличьи анти-мышинные вторичные антитела, сконъюгированные с пероксидазой (rabbit anti-mouse antibodies conjugated with peroxidase, Anti-Mouse IgG HRP, Promega, USA);

2. козы анти-мышинные вторичные антитела, сконъюгированные с пероксидазой (goat anti-human conjugated with peroxidase, предоставлены Gergana Zahmanova, ун-т Пловдива, Болгария).

#### *Электронная микроскопия*

Вирусоподобные частицы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе. Препараты частиц помещали на покрытые углеродом медные сетки и окрашивали 1-2% (w/v) уранил ацетатом. Сетки исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа FEI Tecnai 20, JEOL LEM 1011.

#### *Атомно-силовая микроскопия*

Для атомно-силовой микроскопии использовали микроскоп Integra Prima и программу Nova SPM (NT-MDT, Россия). Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием золотого кантилевера NSG01 (NT-MDT). Образцы белков наносили на сапфировую подложку, покрытую слюдой, сушили при комнатной температуре. PBS использовали в качестве отрицательного контроля.

#### *Лабораторные животные*

Для оценки иммуногенности рекомбинантных белков были использованы линейные мыши Balb/c массой 18-20 г. (возраст 6-8 недель). Животных содержали в виварии ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Все исследования проводили в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

#### *Иммунизация лабораторных животных (выполнялось в НИИ Гриппа)*

Мышей иммунизировали рекомбинантными белками либо внутримышечно, либо интраназально трехкратно с интервалом 3 недели. Интраназальную иммунизацию проводили после ингаляционной анестезии смесью 2 – 3 % изофлюран, 30 % O<sub>2</sub>, 70 % N<sub>2</sub>O. Контрольным мышам вводили PBS.

*Получение сывороток крови и бронхоальвеолярных лаважей (выполнялось в НИИ Гриппа)*

Образцы крови и бронхоальвеолярные смывы (БАЛ) получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после второй и / или третьей иммунизации после эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере (Vet Tech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. После образования сгустков крови образцы помещали на лед и охлаждали в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 400 g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 µL) замораживали при температуре –20 °С. Для получения БАЛ труп животного фиксировали на операционном столике. Производили разрез кожи по средней линии от нижней челюсти. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3 – 5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл PBS. БАЛ центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, отбирали аликвоты надосадка и замораживали их при температуре –20 °С

*Иммуноферментный анализ (выполнялось в НИИ Гриппа)*

Препараты сывороток мышей и препараты бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ) выделяли через 2 недели после второй и / или третьей иммунизации и анализировали с помощью ИФА. Титры антител определяли индивидуально у 5 мышей каждой группы. ИФА проводили общепринятым методом. 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали синтетическими пептидами G-11-1, G-50, G-

37, в концентрации 5 мкг/мл (в фосфатном буфере, pH 7,2-7,4), флагеллин в концентрации 3 мкг/мл, A/Aichi/ 2/68 (H3N2) в концентрации 2 мкг/мл, HEV ORF2 в концентрации 3 мкг/мл выдерживали ночь при 4 °С. Планшеты обрабатывали блокирующим буфером (0,01 М PBS, pH 7,2-7,4 с 5%ЭТС) в течение 1 часа при комнатной температуре, отмывали 3 раза PBS с твином. В лунки планшета добавляли 100 мкл 2-х кратных разведений сывороток (начиная с 1:400) в блокирующем буфере, инкубировали 1 час при комнатной температуре. В качестве конъюгата использовали моноклональные крысиные антимышиные IgG (Invitrogen) в разведении 1:2000, меченые пероксидазой хрена, IgA в разведении 1:4000. В качестве субстрата использовали ТМБ (BD Bioscience) – инкубация 15 мин. Учет реакции проводили при длине волны 450нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере, в 2 раза больше, чем сыворотка не иммунизированных мышей в том же разведении.

#### *Синтетические пептиды*

G-50 SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (соответствует M2e штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005);

G-37 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD («консенсусная» последовательность M2e вирусов гриппа А человека);

G-26 SLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD (соответствует M2e штамма A/H1N1pdm09);

G-11-1 SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (соответствует M2e штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005);

G-19 SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD (соответствует M2e штамма A/Duck/Potsdam1402-6/1986);

G-107 TYN AELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV (представляет консенсусную последовательность от 93 до 122 aa HA2 вируса гриппа А первой филогенетической группы, который идентичен части HA2-1 (76 – 130 aa)

G-108 LVALENQHTIDLTDSSEMNKLFKTRRQLRENA (соответствует 99 – 130 aa региону HA2 второй филогенетической группы вируса гриппа А);

G-109 RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQH (соответствует 76 – 106 aa региону HA2 второй филогенетической группы вируса гриппа А).

#### *Вирусы и заражение мышей (проводилось в НИИ Гриппа)*

Для заражения иммунизированных животных использовали вирусы гриппа, A/PR8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Kurgan\05\05 (H5N1). Вирусы вводили интраназально под легким эфирным наркозом.

#### *Репродукция вирусов гриппа в легких (проводилось в НИИ Гриппа)*

На 6 сутки после заражения у 3 мышей из каждой группы после эвтаназии забирали легкие. Легкие гомогенизировали, центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. До начала работы все образцы были заморожены и хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Выделение вируса проводили титрованием легочной суспензии мышей на культуре клеток MDCK. Клетки заражали серийными десятикратными разведениями легочного гомогената от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  и инкубировали в термостате ( $36,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) в течение 72 часов. Уровень репродукции вируса в культуральной жидкости оценивали в реакции гемагглютинации эритроцитов с 1% взвесью в физиологическом растворе. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации и выражали в логарифмах 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы вируса (lg ТЦИД<sub>50</sub>).

#### *Статистическая обработка данных*

Статистическая значимость различий титров вируса в легких оценивали с использованием U-критерий Манна — Уитни. Динамику

изменения массы тела оценивали с использованием программы GraphPad Prismv 5. Сравнение показателей выживаемости и динамики массы тела в различных группах мышей – с использованием тестов Mantel-Cox (log-rank) и Gehan-Breslow-Wilcoxon. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

*Синтетические олигонуклеотиды*

название	последовательность
BlnI_35S_F	ATCCTAGGGTCAACATGGTGGAGCACGA
Nos-T_SnaBI_R	ATTACGTAGATCTAGTAACATAGATGACACCGCG
XhoI_35S_F	ATCTCGAGGTCAACATGGTGGAGCACGA
Nos-T_Bst1107I_R	TAGTATACGATCTAGTAACATAGATGACACCGCG
P19-BHI-F	ATGGATCCATGGAACGAGCTATACAA
P19-SwI-R	ATATTTAAATTTACTCGCTTTCTTTTTTCGAAGG
FlgBH_F	ATGGATCCGCACAAGTAATCAACACTAACAGTCTG T
FlgBH_R	ATGGATCCACGTAACAGAGACAGCACGTTCTGC
AscI-Flg-F	ATGGCGCGCCATGCATCACCATCACCATCACGGA
M2K-SmaI-R	ATCCCGGGAATTAAGCTGGGGTACCCTAATCG
NruI-Flg-F	AT TCGCGA ATG CATCACCATCACCATCACGGA
M2K-AvaI-R	AT CTCGAG AATTAAGCTGGGGTACCCTAATCG
HEV110_Asc-F	TAGGCGCGCCATGGGTATGGCTACTTCTCCTG
HEV-his_R	TACCCGGGCTAATGATGGTGATGGTGATGAGCAAG AGCAGAGTGAGGAGCAAG
ORF2 HEV	CGTAATCCTGGATCACCACC
HEV_Sma-R	ATCCCGGGCTAAGCAAGAGCAGAGTGAGGAG
F_HEV_485_Sna/Xh o	ATCTCGAGTACGTAGGTTCTAGCACCAACCCTAT
R_HEV_485_Xho	ATCTCGAGGTAGGTGGTCTGATCGTACT
M2eh_GS_Xho_F	ATCTCGAGGGAGGTGGATCTGGATCTCTTCTGACCG AGGTGGA
M2eh_GS_Sna_R	TATACGTATCCAGAACCACCTCCATCGGAGCTATCG TTGCATC
TetXAsc	TGTTCTAGAGGCGCGCCGTCACCTAAATAGCTTGGC G
TetBSma	CATTGTACACCCGGGTTCCATTCAGGTCGAGGTG
TetAMV	TGTTCTAGATTTTTATTTTAAATTTCTTTCAAATAC TTCCATCAGGCGCGCCGTCACCTAAATAGCTTGCGC
F_RBD_Cla-Nru-Sac	ATATCGATTTCGCGAGAGCTCGTGCAGCCCACCGAA TCCATCG
R_RBD_Sma-	ATAGGCCTTTACAGCTCGTCATGCCCGGGCACTGTG

HDEL-stop-Stu	GCAGGGGCATGCA
HBcsynth_NCO_F	TACCATGGACATTGACCCTTACAA
HBcsynth_SMA_R	ATCCCGGGTTAACATTGAGATTCCCT
pQtagF	ACTGGCGCGCCAAAATGGCGCATCACCATCACCAT CACGG
pQtagR	ATAGAGCTCCTAAAGTTCATCTTTCTCAGA
F_319_ClaI	TAATCGATGTGCAGCCCACCGAATCCAT
F_15_ClaI	TAATCGATTGTGTGAACCTGACCACAAG
F_319_AscI	ATGGCGCGCCATGGTGCAGCCCACCGAATCCAT
R_541_HDEL STOP_XmaI	ATCCCGGGTTACAGCTCGTCATGGAAGTTCACGCAT TTGTTCT
R_524_HDEL STOP_XmaI	ATCCCGGGTTACAGCTCGTCATGCACTGTGGCAGG GGCATGCA
R_1210_HDEL STOP_XmaI	ATCCCGGGTTACAGCTCGTCATGGGGCCACTTGATG TACTGCT
R_541_6his STOP_XmaI	ATCCCGGGTTAATGATGGTGATGGTGATGGAAGTT CACGCATTTGTTCT
R_524_6his STOP_XmaI	ATCCCGGGTTAATGATGGTGATGGTGATGCACTGTG GCAGGGGCATGCA

Все ПЦР-фрагменты клонировали в векторе pGEM-T (Promega). Вставки секвенировали со стандартных праймеров F (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) и R (CAG GAA ACA GCT ATG ACC) методом Сэнгера [Sanger *et al.*, 1977].

### Синтетические гены

- *Последовательность гена p24*

```

ggatcc  gaa ATG  cgg  gtg  ata  gta  tca  cca  tac  gaa  gct  gaa  gac  att  tta  aaa  aga
           M   R   V   I   V   S   P   Y   E   A   E   D   I   L   K   R
tca  aca  gac  atg  cta  cga  aac  att  gat  agc  ggt  gtt  ttg  tct  aca  aag  gaa  tgc  att
   S   T   D   M   L   R   N   I   D   S   G   V   L   S   T   K   E   C   I
aag  gct  ttc  agc  acc  atc  act  aga  gac  ctg  cac  tgt  gca  aag  gca  tct  tac  caa  tgg
   K   A   F   S   T   I   T   R   D   L   H   C   A   K   A   S   Y   Q   W
gga  gtt  gac  aca  ggt  ttg  tat  caa  cgt  aat  tgc  gca  gaa  aag  cac  ctt  att  gat  aca
   G   V   D   T   G   L   Y   Q   R   N   C   A   E   K   H   L   I   D   T
gtt  gaa  agt  aac  ata  agg  ttg  gca  cag  ccg  ctt  gtt  agg  gag  aag  gta  gca  gtg  cat
   V   E   S   N   I   R   L   A   Q   P   L   V   R   E   K   V   A   V   H
ttt  tgc  aag  gat  gag  cct  aaa  gaa  ctt  gtt  gcc  ttc  ata  act  aga  aaa  tat  gtc  gaa
   F   C   K   D   E   P   K   E   L   V   A   F   I   T   R   K   Y   V   E

```

ttg act gga gta ggt gtt agg gaa gct gtt aaa agg gag atg cgg agt ctc act aag  
 L T G V G V R E A V K R E M R S L T K  
 aca gtt ctc aat aag atg tcc ctc gaa atg gca ttc tat atg tca cct aga gct tgg  
 T V L N K M S L E M A F Y M S P R A W  
 aag aac gca gaa tgg ctg gaa ttg aaa ttt agt ccc gta aag att ttc aga gat ttg  
 K N A E W L E L K F S P V K I F R D L  
 ctt ctc gat gtt gaa act ctc aat gaa ctc tgc gca gag gat gac gtt cat gtc gat  
 L L D V E T L N E L C A E D D V H V D  
 aaa gtt aat gaa aac ggt gat gag aac cat gat ctc gaa ctt cag gat gag tgc tga  
 K V N E N G D E N H D L E L Q D E C -  
 atttaaat tgtaca

- *Последовательность SP<sub>synth</sub> (AscI- SP-6His-gggsg-ClaI-at-SmaI)*

GGCGCGCC ATG att atg gca agc agt aag ctg ctg tca ctg gct ctc ttc ctt gca  
 M I M A S S K L L S L A L F L A  
 ctc ctg agt cat gct aac agc cat cac cat cac cat cat gga ggt ggt tct gga  
 L L S H A N S H H H H H H G G G S G  
 atcgat at cccggg

- *Последовательность RBDdelta<sub>synth</sub>*

ggcgcgcc ATG att atg gca agc agt aag ctg ctg tca ctg gct ctc ttc ctt gca ctc  
 M I M A S S K L L S L A L F L A L  
 ctg agt cac gct aac agc atc gat tgc cga gag ctc ggt tca ggt tct gtc cag ccg  
 L S H A N S I D S R E L G S G S V Q P  
 aca gag agt atc gtc aga ttc cca aac att acg aat ctc tgc cct ttc ggt gaa gta  
 T E S I V R F P N I T N L C P F G E V  
 ttt aac gct aca agg ttc gca agc gtg tat gca tgg aat agg aag agg att tcc aac  
 F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N  
 tgt gtc gct gat tac tct gtg ctg tat aat tcc gca tca ttc agc aca ttt aag tgt  
 C V A D Y S V L Y N S A S F S T F K C  
 tac ggt gtt tct cca aca aaa ctt aac gac tta tgt ttc acg aat gtt tat gct gat  
 Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D  
 agt ttt gtt atc agg ggg gac gag gta agg caa ata gct cct ggg cag acg gga aag  
 S F V I R G D E V R Q I A P G Q T G K  
 atc gct gat tac aac tat aaa ctc ccc gac gat ttc acc gga tgc gtg att gcc tgg  
 I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W  
 aac tca aac aac ctc gac tca aag gtt ggt ggg aat tat aac tac cgt tat cgt ttg  
 N S N N L D S K V G G N Y N Y R Y R L  
 ttt cgt aaa tca aac ctg aaa ccg ttc gag cga gac ata agc aca gaa att tac  
 F R K S N L K P F E R D I S T E I Y  
 cag gca ggt tca aaa ccc tgt aac ggc gta cag ggg ttc aat tgc tac ttt cct ttg  
 Q A G S K P C N G V Q G F N C Y F P L



caa agc tac ggg ttt cag ccc aca aat ggt gtt ggg tat cag ccg tac aga gtg gtt  
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V  
 gtc ctt tcc ttt gaa ctc ctt cac gcc cca gcc act gtc tgt ggt cct aaa aaa agt  
 V L S F E L L H A P A T V C G P K K S  
 acg aac ttg gtt aag aac aag tgt gtg aat ttc ccc ggg cac cat cac cac cac cat  
 T N L V K N K C V N F P G H H H H H H  
 cac cat ggt ggg tct cat gac gag ctg taa aggcct  
 H H G G S H D E L -

- *Последовательность гена Hbc\_synth*

ATG gac att gac cct tac aaa gaa ttt gga gct act gtg gag  
 M D I D P Y K E F G A T V E

ctt ctc agc ttt ttg cct tct gac ttc ttt cct tct gtc agg gat ctc ctt gac act  
 L L S F L P S D F F P S V R D L L D T  
 gcc tca gct ctt tat agg gaa gcc ttg gag tct cct gag cat tgc tca cct cac cat  
 A S A L Y R E A L E S P E H C S P H H  
 act gca ctc agg caa gcc att ctc tgc tgg gga gaa ttg atg act ctt gct acc tgg  
 T A L R Q A I L C W G E L M T L A T W  
 gtg ggt aac aat cta gag gac cca gca tcc aga gat ctt gtt gtt aac tat gtt aat  
 V G N N L E D P A S R D L V V N Y V N  
 act aat gtg ggt ttg aag atc agg caa ctc ttg tgg ttt cat ata tct tgc ctt act  
 T N V G L K I R Q L L W F H I S C L T  
 ttt gga aga gag act gta ctt gaa tat ttg gtc tct ttt gga gtg tgg att aga act  
 F G R E T V L E Y L V S F G V W I R T  
 cct cca gcc tat aga cca cca aat gcc cct atc ttg tcg act ctt cca gaa act act  
 P P A Y R P P N A P I L S T L P E T T  
 gtt gtt cga aga agg gac agg ggc aga tcc cct aga cgt aga act ccc agc cct aga  
 V V R R R D R G R S P R R R T P S P R  
 aga agg aga tcc cca tct cct agg agg aga agg tct caa tct agg gaa tct caa tgt  
 R R R S P S P R R R R S Q S R E S Q C  
 taa  
 -

- *Последовательность гена M2epHbc (AscI-BamHI-AMV-M2e-Hbc-SmaI)*

GGCGCGCC ggatcc **TTTTTATTTTAAATTTTCTTTCAAATACTTCATCA** a

ATG tct ctt ctg act gaa gtg gaa act cca act cgt aac gga tgg gaa tct aaa tct  
**M S L L T E V E T P T R N G W E S K S**  
 tca gat agc tct gac atg gac att gac cct tac aaa gaa ttt gga gct act gtg gag  
**S D S S D** M D I D P Y K E F G A T V E  
 ctt ctc agc ttt ttg cct tct gac ttc ttt cct tct gtc agg gat ctc ctt gac act  
 L L S F L P S D F F P S V R D L L D T  
 gcc tca gct ctt tat agg gaa gcc ttg gag tct cct gag cat tgc tca cct cac cat

A S A L Y R E A L E S P E H C S P H H  
 act gca ctc agg caa gcc att ctc tgc tgg gga gaa ttg atg act ctt gct acc tgg  
 T A L R Q A I L C W G E L M T L A T W  
 gtg ggt aac aat cta gag gac cca gca tcc aga gat ctt gtt gtt aac tat gtt aat  
 V G N N L E D P A S R D L V V N Y V N  
 act aat gtg ggt ttg aag atc agg caa ctc ttg tgg ttt cat ata tct tgc ctt act  
 T N V G L K I R Q L L W F H I S C L T  
 ttt gga aga gag act gta ctt gaa tat ttg gtc tct ttt gga gtg tgg att aga act  
 F G R E T V L E Y L V S F G V W I R T  
 cct cca gcc tat aga cca cca aat gcc cct atc ttg tcg act ctt cca gaa act act  
 P P A Y R P P N A P I L S T L P E T T  
 gtt gtt cga aga agg gac agg ggc aga tcc cct aga cgt aga act ccc agc cct aga  
 V V R R R D R G R S P R R R R T P S P R  
 aga agg aga tcc cca tct cct agg agg aga agg tct caa tct agg gaa tct caa tgt  
 R R R S P S P R R R R S Q S R E S Q C  
 taa cccggg

-

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1. Создание экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля.

В работе для получения рекомбинантных белков в растениях использовали метод транзientной экспрессии в *Nicotiana benthamiana*.

На первом этапе использовали бинарный вектор pNRGFP [Марданова и др., 2007; Mardanova *et al.*, 2008]. Помимо генетических детерминант, обеспечивающих поддержание вектора в клетках *A. tumefaciens* и *E. coli*, данный вектор содержит промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (промотор 35S) и ген *gfp*, за которым следует терминатор транскрипции nosT (рис. 4.1.1). Ген *gfp* кодирует зеленый флуоресцентный белок, который широко применяется в качестве репортерного белка в различных областях молекулярной биологии.



Рисунок 4.1.1. Схема экспрессионного вектора pNRGFP. Показана структура кассеты экспрессии в области Т-ДНК рекомбинантного бинарного вектора: 35S, промотор РНК вируса мозаики цветной капусты; *gfp*, ген зеленого флуоресцентного белка; Nos-T, терминатор нопалин синтазы *A. tumefaciens*; LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

Для переноса генов в клетки растения агробактерии, содержащие бинарные векторы, вводят в растения с помощью шприца без иглы (см. Материалы и методы).

После проникновения агробактерий в межклеточное пространство Т-ДНК переносится из агробактерии в растительную клетку, происходит транскрипция с промотора 35S, трансляция мРНК и синтез белка GFP (Рис. 4.1.2). Следует подчеркнуть, что весь белок GFP синтезируется именно в

растительной клетке, а не в агробактериях, поскольку ген *gfp* содержал интрон в своей кодирующей области.

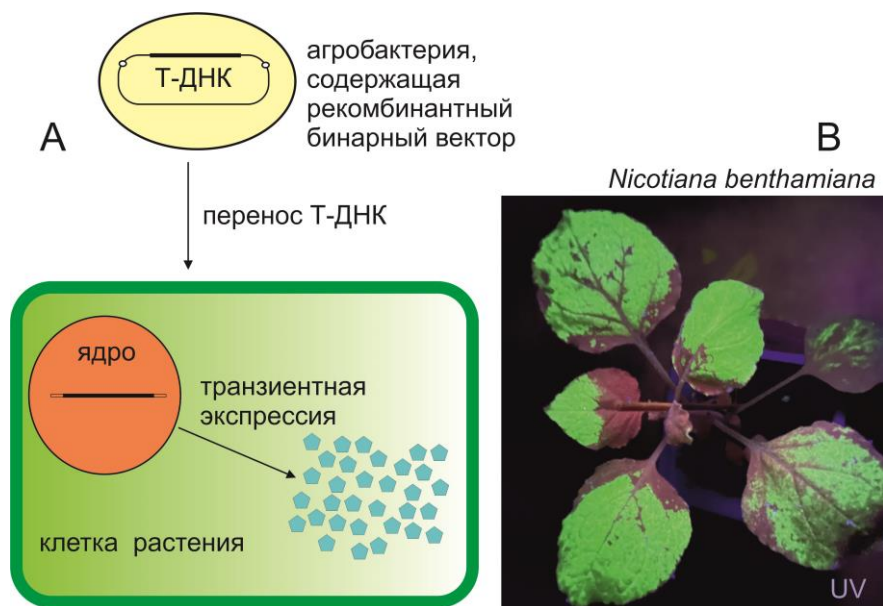


Рисунок 4.1.2. Транзистентная экспрессия чужеродных генов в растениях с помощью агроинфильтрации бинарным вектором pNRGFP. (А) – общий механизм процесса, (В) – визуализация экспрессированного в растении GFP (зеленый флуоресцентный белок) с помощью освещения листа ультрафиолетовым светом.

При использовании подобных векторов сложно добиться высокого уровня синтеза белков. Для повышения эффективности векторов используют различные подходы. Это использование самореплицирующихся вирусных векторов, трансляционных энхансеров, супрессоров сайленсинга и др. Нами были сконструированы высокоэффективные экспрессионные векторы, в которых использовались различные подходы для повышения эффективности векторов и их удобства для синтеза белков медицинского назначения.

#### *Экспрессионные векторы на основе генома X вируса картофеля*

Высокий уровень экспрессии рекомбинантных генов в растениях может быть достигнут за счет использования векторов на основе геномов вирусов растений. В качестве основы для создания рекомбинантных векторов для экспрессии чужеродных генов в растениях был использован вектор на основе генома X вируса картофеля (ХВК) pA7248 (PVXdt\_GFP) [Комарова и

др. 2006], основанный на геноме ХВК штамма UK3 (GenBank M95516). Данный вектор содержит 5'-нетранслируемый участок генома ХВК, ген РНК-зависимой РНК полимеразы, первый промотор субгеномной РНК ХВК, целевой ген *gfp*, последние 60 нуклеотидов гена белка оболочки и 3'-нетранслируемый участок генома ХВК (рис. 4.1.3). Вся эта конструкция помещена между 35S промотором и терминатором и клонирована в бинарном векторе pBIN19 [Bevan *et al.*, 1984].

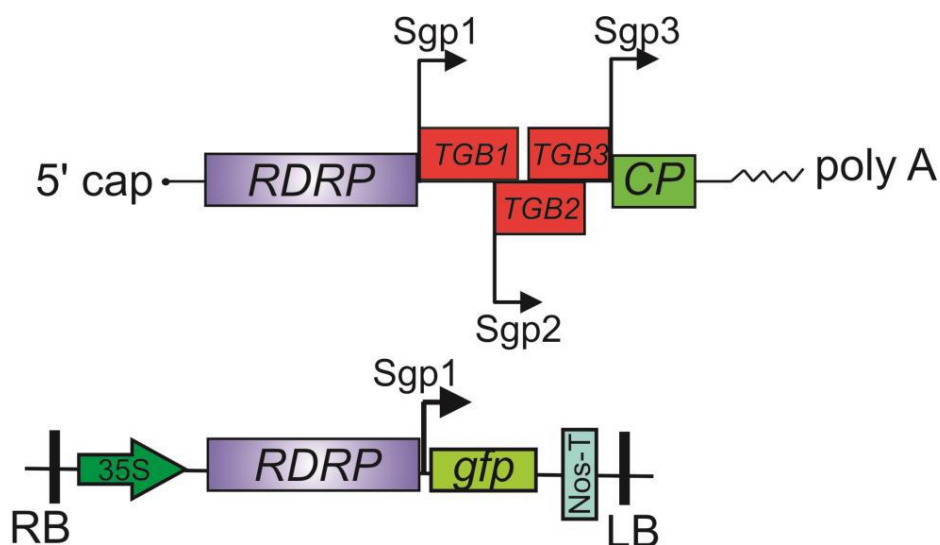


Рисунок 4.1.3. Структура генома X-вируса картофеля (А) и экспрессионного вектора pA7248 (В). Показаны гены РНК-зависимой РНК полимеразы (RDRP), тройной блок генов (TGB1, TGB2 и TGB3), ген белка оболочки (CP), Sgp1, Sgp2, Sgp2 – промоторы субгеномных РНК ХВК; 35S – промотор, Nos-T – терминатор нопалин синтазы агробактерии *A. tumefaciens*, *gfp* – ген зеленого флуоресцентного белка, LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

К недостаткам данного вектора можно отнести отсутствие уникальных сайтов рестрикции для клонирования целевого гена, что затрудняет его практическое применение. На первом этапе была осуществлена модификация данного вектора таким образом, чтобы клонирование целевого гена могло быть осуществлено в один этап.

Для этого были осуществлены генно-инженерные манипуляции, в результате которых получен вектор pA7248Т, содержащий вместо *gfp* ген

устойчивости к тетрациклину, фланкированный двумя уникальными сайтами рестрикции *AscI* (GGCGCGCC) и *SmaI* (CCCGGG).

Сконструированный вектор pA7248T дает возможность осуществлять клонирование целевого гена в один этап с использованием уникальных сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции *AscI* (GGCGCGCC) и *SmaI* (CCCGGG).

#### *Оптимизации вирусной экспрессионной системы за счет повышения эффективности трансляции мРНК целевого гена*

Повышение эффективности трансляции мРНК осуществляли за счет введения трансляционного энхансера в 5'-НТО целевого гена, *gfp*, в векторе pA7248T. В качестве трансляционного энхансера использовали лидерную последовательность РНК вируса мозаики люцерны (AMV). Известно, что введение последовательности AMV перед стартовым кодоном повышает эффективность трансляции мРНК [Jobling *et al.*, 1987]. Однако для фитовирусной системы экспрессии такой подход ранее не использовался.

Нами был создан вектор pA7248AMVT, содержащего энхансер AMV (TTTTTATTTTTAATTTTCTTTCAAATACTTCCATCA), на основе вектора pA7248T (рис 4.1.4).

Для сравнения эффективностей двух векторов pA7248T и pA7248AMVT ген устойчивости к тетрациклину был заменен на ген зеленого флуоресцентного белка, *gfp*, с использованием сайтов рестрикции *AscI* / *SmaI*. Полученные векторы pA7248GFP, pA7248AMVGFP вводили в клетки *A. tumefaciens* GV3101. Полученные конструкции переносили в клетки растений с помощью агроинfiltrации. Листья *N. benthamiana* инfiltrировали равными количествами агробактерий, содержащими рекомбинантные бинарные векторы. Растения выращивали в течение 4 дней. Через трое суток из зон агроинfiltrации выделяли белковые препараты. Полученные препараты анализировали методом флуориметрического анализа. В качестве

отрицательного контроля использовали неинфильтрованные листья растения *N. benthamiana*.

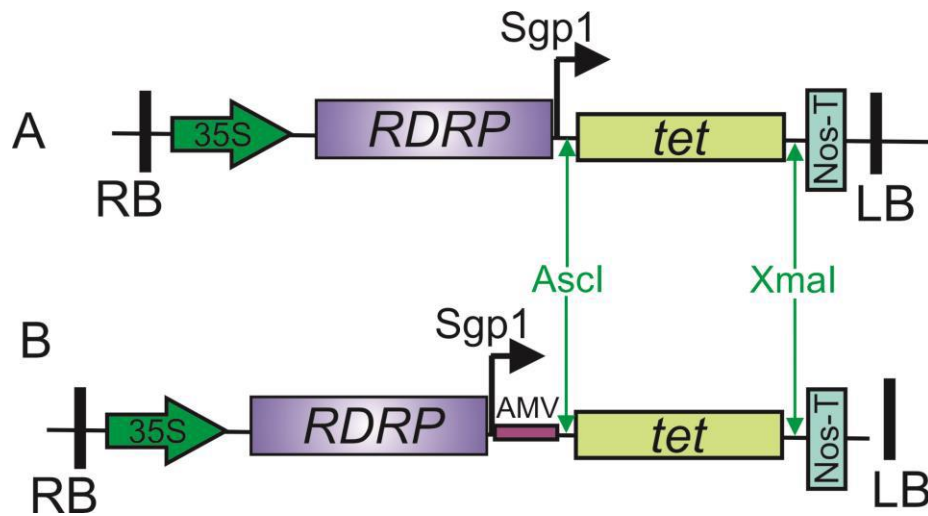


Рисунок 4.1.4. Схема вирусных векторов pA7248T (A) и pA7248AMVT (B). Показана T-ДНК область бинарного вектора. 35S – промотор, Nos-T – терминатор; RDRP – РНК-зависимая РНК-полимераза ХБК; Sgp1 – субгеномный промотор гена транспортного белка 25К ХБК; AMV – лидерная последовательность РНК 4 вируса мозаики люцерны; 6His – последовательность шести остатков гистидина; tet – ген устойчивости к тетрациклину; LB и RB – левая и правая границы T-ДНК.

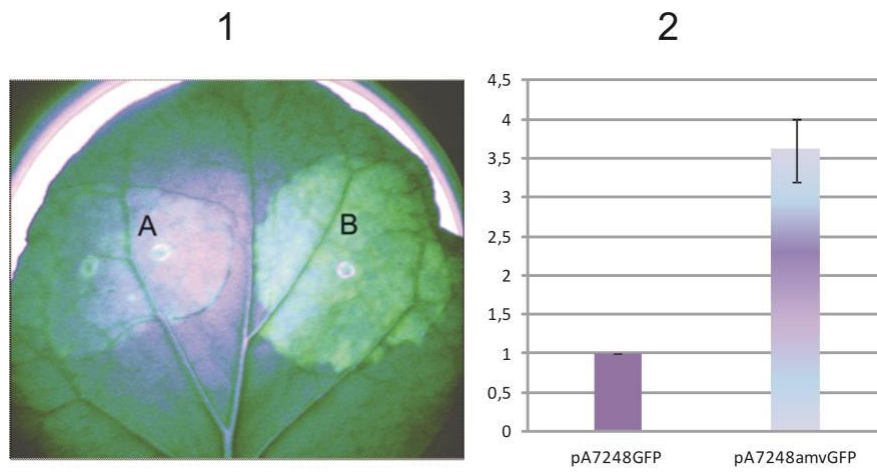


Рисунок 4.1.5. Трансляционный энхансер AMV увеличивает эффективность экспрессии генов в растениях *N. benthamiana*. (1) УФ визуализация синтеза GFP в листьях растений *N. benthamiana*, инокулированных агробактериями, несущими векторы pA7248GFP (A) и pA7248AMVGFP (B). (2) Измеренные флуориметрическим методом относительные уровни GFP в белковых препаратах.

Было показано, что наличие в вирусном векторе последовательности AMV существенно повышала уровень накопления целевого белка в листьях зараженного растения. Поскольку общее количество синтезируемого GFP в целом отражает как процессы трансляции мРНК, так и ее синтеза, был выполнен контрольный эксперимент по сравнению концентраций мРНК GFP. С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени было установлено, что уровни накопления мРНК GFP практически одинаковы. В результате можно сделать вывод, что введение трансляционного энхансера AMV повышает уровень продукции GFP в растении *N. benthamiana* в 3-4 раза за счет повышения эффективности трансляции.

Для повышения эффективности экспрессии целевых генов в растениях *N. benthamiana* на следующем этапе проводили серию модификаций вектора pA7248AMVGFP. В данные модификации входило (i) уменьшение размера вектора (“backbone”), (ii) включение гена супрессора сайленсинга в вектор.

Основная кассета экспрессии была получена из вектора pA7248AMVGFP. У этого вектора есть два недостатка. Во-первых, это большой размер, поскольку он основан на плазмиде pBIN19, которая сама имеет длину почти 12 т.п.н. Во-вторых, отсутствие гена(ов) супрессоров сайленсинга. Поэтому эффективная экспрессия целевых белков в растениях с помощью этого вектора требует совместной инфильтрации листьев с другим штаммом *A. tumefaciens*, который обеспечивает экспрессию супрессора сайленсинга.

#### *Уменьшение размера экспрессионного вектора*

На первом этапе уменьшали размер экспрессионного вектора. Бинарный вектор pEAQselectK [Sainsbury *et al.*, 2009] использовался в качестве основы. Эта плазида имеет длину всего 6974 п.н. и содержит внутри области T-ДНК сайты для клонирования.

Основная кассета экспрессии была получена из вектора pA7248AMVGFP. На первом этапе мы перенесли всю кассету экспрессии на



основе PVX из pA7248AMVGFP в pEAQselectK, чтобы минимизировать размер вектора.

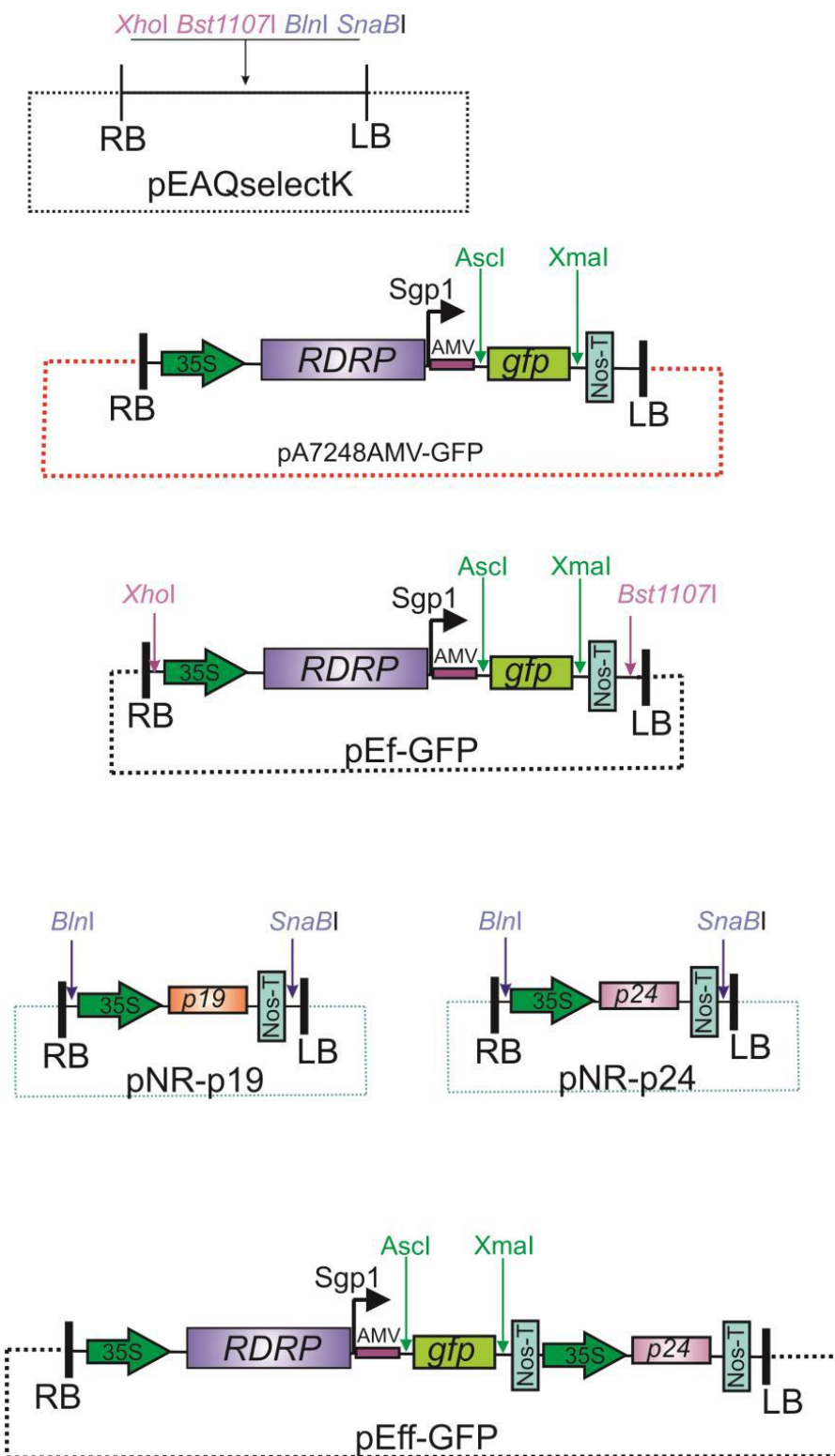


Рисунок 4.1.6. Схема получения экспрессионного вектора pEff-GFP.

Полученный вектор pEf-GFP (рис. 4.1.6) имеет длину около 13 т.п.н., в то время как размер исходного pA7248AMVGFP составляет почти 18 т.п.н. Для сравнения эффективности pEf-GFP и pA7248AMVGFP эти векторы вводили в штамм *A. tumefaciens* GV3101, который использовали для инфильтрации листьев растений *N. benthamiana*. Зоны агроинфильтрации для двух векторов располагались в пределах одного листа. Синтез GFP контролировали УФ-облучением. Инфильтрированные растения выращивали в течение 5 дней, после чего листья собирали и получали экстракты растворимого белка. Синтезированный GFP анализировали с помощью SDS-PAGE и количественно определяли флуориметрическим методом (рис. 4.1.7). Результаты показывают, что уменьшение размера “backbone” вектора увеличивает уровни экспрессии белка примерно на 40% по сравнению с исходным вектором pA7248AMVGFP. Таким образом, вектор pEf-GFP использовали для последующих улучшений.

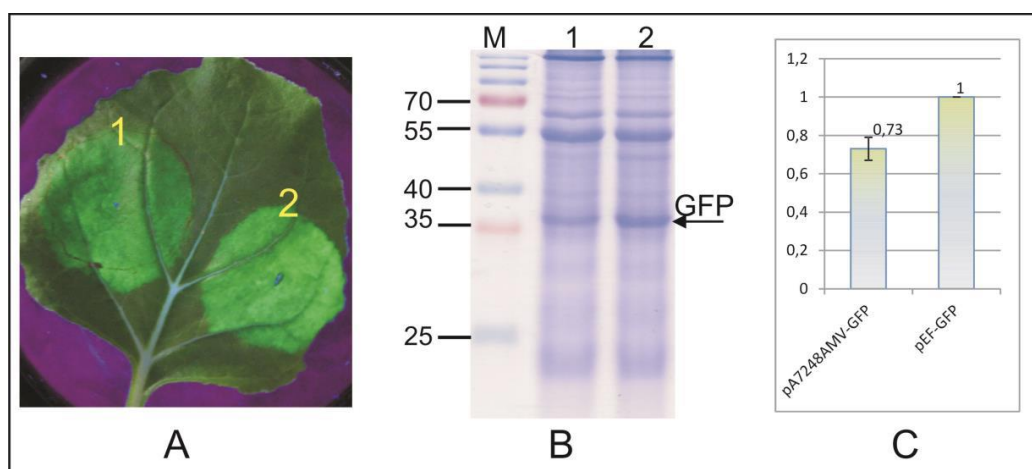


Рисунок 4.1.7. Уменьшение размера вектора экспрессии увеличивает его эффективность. Листья растения *N. benthamiana* инокулировали агробактериями, несущими либо pA7248AMVGFP (1), либо pEf-GFP (2). (A) Визуализация GFP, синтезированного в агроинфильтрованных листьях *N. benthamiana*. (B) SDS-PAGE анализ белков, выделенных из агроинфильтрованных зон. М, маркер молекулярной массы (кДа). (C) Измеренные флуориметрическим методом относительные уровни GFP в белковых препаратах.

## Создание вирусного вектора, способного коэкспрессировать супрессор сайленсинга

Посттранскрипционный сайленсинг генов является одним из наиболее важных факторов, ограничивающих эффективность экспрессии рекомбинантных белков в растениях [Chicas and Macino, 2001]. Хотя это не оказало значительного отрицательного воздействия на экспрессию GFP, эта проблема оказалась более важной для экспрессии «немодельных» белков.

На первом этапе мы оценили эффективность двух известных супрессоров сайленсинга, P24 и P19, в нашей векторной системе. Использование супрессоров сайленсинга, таких как белок P19 вируса кустистой карликовости томатов (TBSV, Tomato bushy stunt virus), оказывает огромное влияние на эффективность продукции рекомбинантных белков в растениях [Peuret and Lomonosoff, 2015]. Аналогичным образом, белок P24 из вируса скрученных листьев виноградной лозы (GRLaV2, grapevine leafroll-associated virus-2) был идентифицирован как сильный супрессор сайленсинга [Chiba *et al.*, 2006].

Последовательность гена p24 была адаптирована по кодоновому составу для экспрессии в *N. benthamiana* и синтезирована *in vitro* (Евроген).

Оба гена-супрессора были клонированы между промотором 35S и терминатором posT, и эти кассеты экспрессии были включены в бинарный вектор pEf. Затем мы сравнили уровни экспрессии GFP в листьях *N. benthamiana*, инфильтрированных (i) только pEf-GFP, (ii) одновременно pEf-GFP и pEf-p24, и (iii) одновременно pEf-GFP и pEf-p19. Образцы белковых препаратов были выделены через 3 суток после инфильтрации. Результаты показывают, что оба супрессора сайленсинга увеличивают уровень экспрессии GFP примерно в 3 раза, и что между ними нет значительной разницы (рис. 4.1.8). Для дальнейшей работы нами был выбран P24.

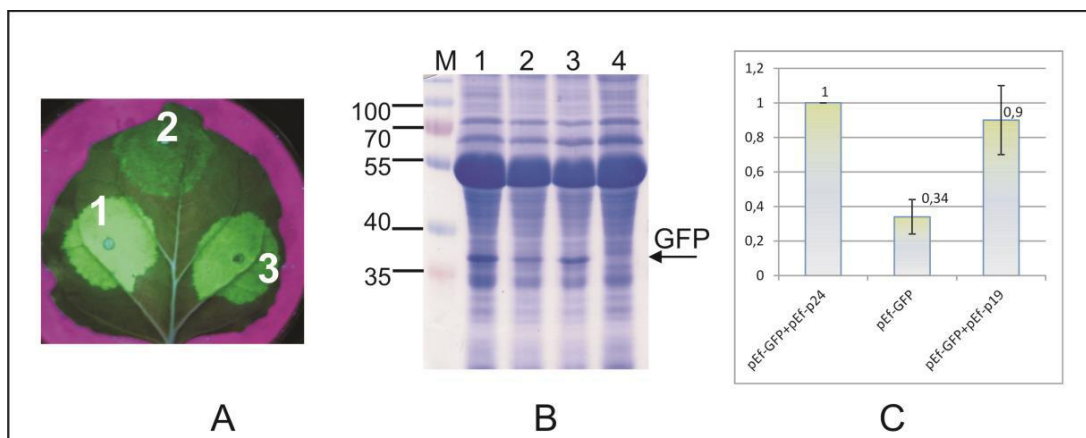


Рисунок 4.1.8. Использование супрессоров сайленсинга увеличивает эффективность системы вирусной экспрессии. Листья подвергали агроинфильтрации одновременно с pEf-GFP и pEf-p24. (1), только с pEf-GFP (2) и одновременно с pEf-GFP и pEf-p19 (3). (А) УФ визуализация GFP, синтезированного в агроинфильтрованных листьях *N. benthamiana*. (В) SDS-PAGE анализ белков, выделенных из листьев *N. benthamiana*. М, маркер молекулярной массы (кДа). На дорожке 4 показаны белки, выделенные из неинфильтрированной зоны того же листа *N. benthamiana*. (С) Измеренные флуориметрическим методом относительные уровни GFP в белковых препаратах.

На следующем этапе нами был создан вектор pEff-GFP, содержащий две кассеты экспрессии в пределах одного вектора. Первая кассета экспрессии содержала промотор 35S, 5'-UTR PVX, RDRP, Sgp1, *gfp*, 3'-UTR PVX и Nos-T, а вторая кассета содержала промотор 35S, p24 и Nos-T. Этот вектор устраняет необходимость использования коинфильтрации. Однако вставка дополнительной кассеты экспрессии в pEf-GFP увеличивает размер вектора, что может отрицательно влиять на эффективность системы экспрессии. Поэтому мы сравнили уровень продукции GFP в случае использования одного вектора pEff-GFP с уровнем, полученными при совместной инфильтрации pEf-GFP и pEf-p24. Продукция GFP определялась через 3 дня после агроинфильтрации. Мы обнаружили, что уровень продукции GFP был близким для двух вариантов (рис. 4.1.9).

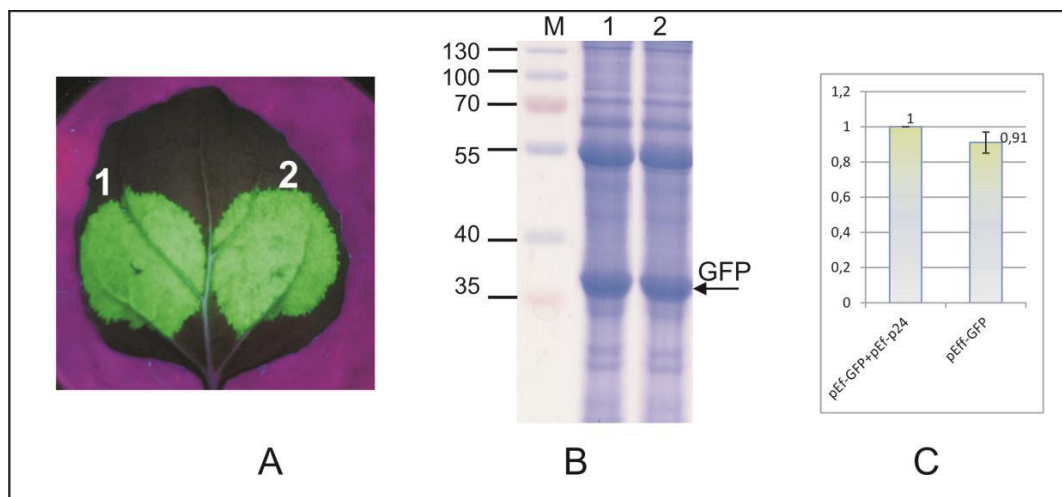


Рисунок 4.1.9. Высокий уровень продукции GFP системой экспрессии pEff. Листья подвергали агроинfiltrации одновременно с pEf-GFP и pEf-p24 (1) или с только pEff-GFP (2). (A) Визуализация GFP, синтезированного в агроинfiltrированных листьях *N. benthamiana*. (B) SDS-PAGE анализ белков, выделенных из агроинfiltrированных листьев *N. benthamiana*. M, маркер молекулярной массы (кДа). (C) Измеренные флуориметрическим методом относительные уровни GFP в белковых препаратах.

В оптимальных условиях вектор pEff обеспечивает уровень экспрессии GFP около 30% от общего растворимого белка (рис. 4.1.10), что соответствует примерно 1 мг / г свежей ткани листьев.

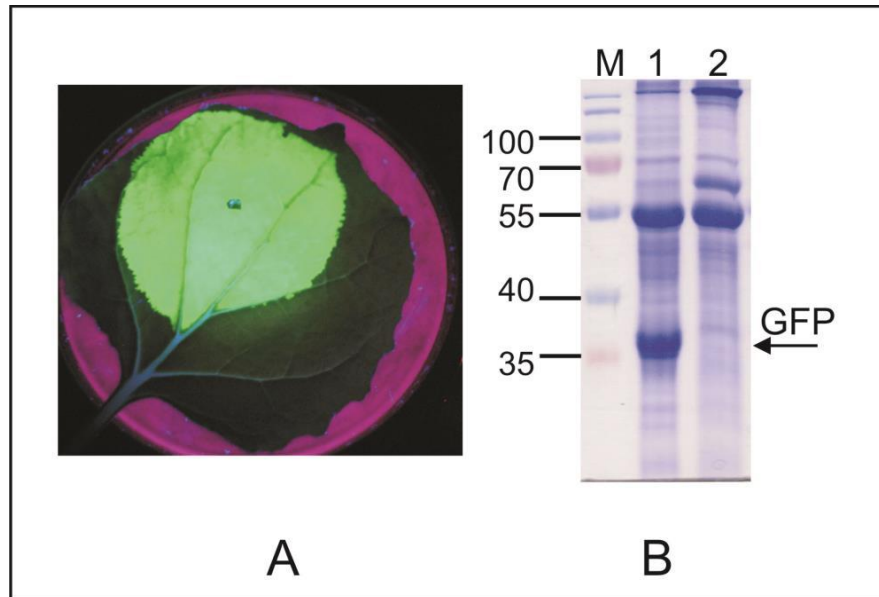


Рисунок 4.1.10. Зеленый флуоресцентный белок эффективно синтезируется в клетках растения *N. benthamiana* с помощью вектора pEff-GFP. (А) Визуализация GFP, синтезированного в агроинфильтрованных листьях *N. benthamiana*. (В) SDS-PAGE анализ белков, выделенных из агроинфильтрованных листьев *N. benthamiana*. М, маркер молекулярной массы (кДа); 1 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEff-GFP, 2 – препарат растворимых белков из неинокулированных листьев *N. benthamiana*.

Таким образом, основными преимуществами экспрессионного вектора pEff-GFP являются (1) способность к репликации в клетках растений, (2) наличие трансляционного энхансера, (3) уменьшенный размер и уникальные сайты для клонирования целевого гена в одну стадию, (4) наличие в векторе дополнительной кассеты экспрессии гена супрессора сайленсинга Р24.

На рис. 4.1.11 представлена общая схема транзientной экспрессии генов в растениях с использованием вектора pEff-GFP.

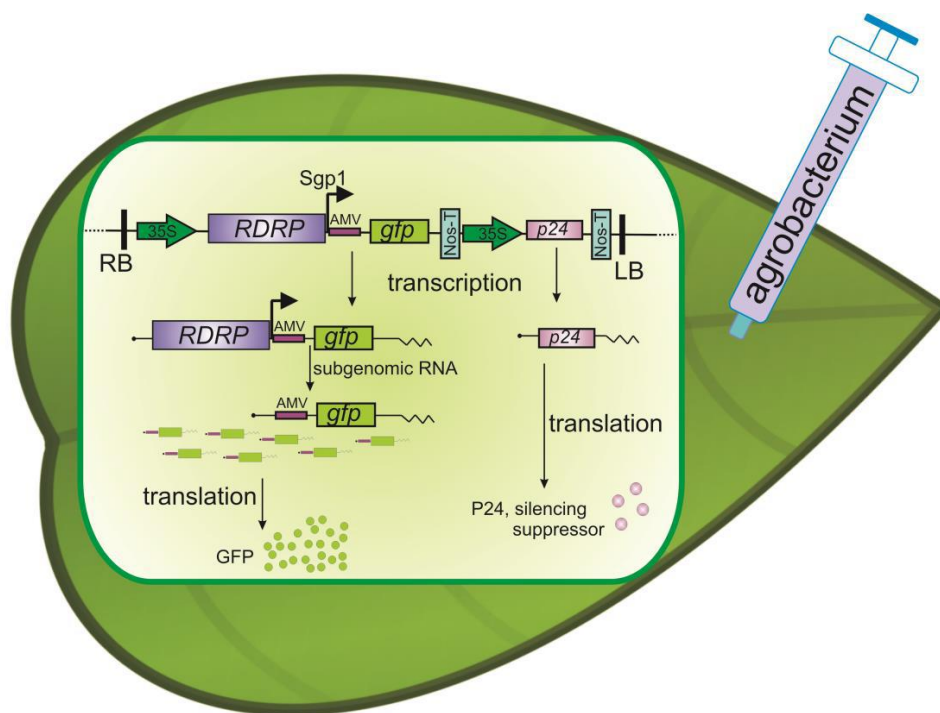


Рисунок 4.1.11. Общая схема транзientной экспрессии генов в растениях с использованием вектора pEff-GFP.

Для растений итоговый выход рекомбинантного белка зависит не только от эффективной экспрессии гена, но и от стабильности полученного белка. Протеазы, присутствующие в различных компартментах растительных клеток, могут резко менять стабильность чужеродных белков как *in vivo*, так и *in vitro*. Протеазы растительной клетки могут представлять собой основное препятствие для эффективного синтеза рекомбинантных белков. Вакуолярные протеазы, действующие в слабокислых условиях, рассматриваются как потенциально нарушающие целостность рекомбинантных белков. Для предотвращения нежелательного протеолиза *in vivo* были предложены подходы по перенаправлению синтезируемых белков в такие компартменты, как эндоплазматический ретикулум. Для данной цели в последовательность рекомбинантного белка вводят специальные сигнальные пептиды.

Мы использовали стратегию “направления” синтезируемого белка в эндоплазматический ретикулум. Для этой цели использовали N-концевой сигнальный пептид (SP) MIMASSKLLSLALFLALLSHANS из *Phaseolus*



*vulgaris*, «направляющий» белок в эндоплазматический ретикулум и последовательность HDEL на С-конце, которая обеспечивает удержание белка в нем [Gomord *et al.*, 1997; Faye *et al.*, 2005].

Новый вектор получали на основе вектора pEff-GFP. В 5'-концевую часть экспрессионной кассеты клонировали последовательность, кодирующую SP, полигистидиновый таг и глицин-сериновый линкер [Pogrebnyak *et al.*, 2005] для лучшего разделения вспомогательных последовательностей от последовательности целевого белка.

Синтетическую последовательность фрагмента ДНК, кодирующую сигнальный пептид, 6 гистидинов, гибкий линкер, а также последовательности узнавания эндонуклеазами рестрикции *AscI*, *ClaI*, *XmaI* синтезировали *in vitro* (Евроген).

Далее ген *gfp* в векторе pEff заменяли на эту последовательность с использованием сайтов рестрикции *AscI* и *XmaI*. В результате был получен вектор pEff-SP (Рис. 4.1.12). Для клонирования целевых генов в полученном векторе присутствуют уникальные сайты рестрикции *ClaI* и *SmaI* (*XmaI*).

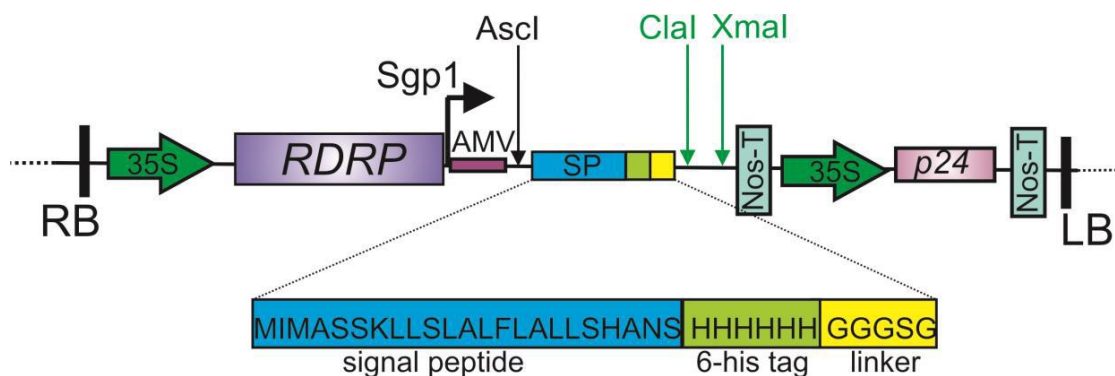


Рисунок 4.1.12. Схема экспрессионного вектора pEff-SP. Показана область Т-ДНК рекомбинантного бинарного вектора: RDRP – РНК зависимая РНК полимераза ХБК; Sgp1 – первый субгенный промотор ХБК. 35S – промотор РНК вируса мозаики цветной капусты, Nos-T – терминатор, p24 – ген супрессора сайленсинга, SP – сигнальный пептид. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

На следующем этапе была произведена модификация вектора pEff-SP для более удобного клонирования. Для этого по сайтам рестрикции *ClaI* / *SmaI* в векторе pEff-SP был клонирован ПЦР-фрагмент, содержащий *ClaI* –



*NruI* – *SacI* — целевой ген (в данном случае - кодирующий рецептор-связывающий домена S1 белка вируса SARS-Cov2) – *XmaI* – CATGACGAGCTG (кодирует HDEL) – стоп-кодон TAA) – *StuI*.

В данном векторе присутствует кодирующая HDEL последовательность, адаптированная для экспрессии в *N. benthamiana* (CAT GAC GAG CTG). В результате был получен универсальный экспрессионный вектор pUEff (Universal Effective) (рис. 4.1.13). В данном векторе можно осуществлять клонирование с использованием сайтов рестрикции *AscI* / *XmaI*. Также при необходимости наличия сигнального пептида клонирование может быть осуществлено с использованием уникальных сайтов рестрикции *ClaI-NruI-SacI* в паре с сайтом рестрикции *XmaI*.

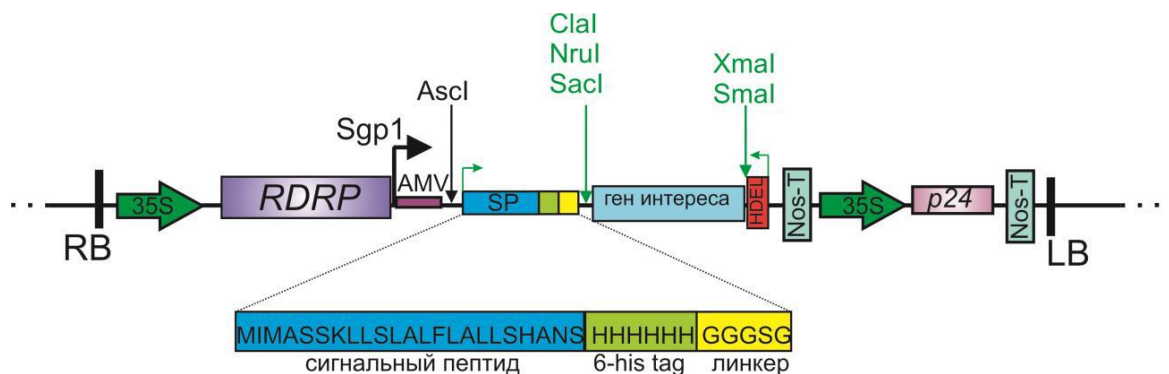


Рисунок 4.1.13. Схема экспрессионного вектора pUEff. Показана область Т-ДНК рекомбинантного бинарного вектора: RDRP – РНК зависящая РНК полимеразы ХВК; Sgp1 – первый субгеномный промотор ХВК. 35S – промотор РНК вируса мозаики цветной капусты, Nos-T –терминатор, p24 – ген супрессора сайленсинга, SP – сигнальный пептид. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

Также дополнительно был получен экспрессионный вектор pAeff (Advanced Effective vector), который в отличие от pUEff позволяет получать

белки с 8-гистидиновым тагом, расположенным на С-конце (рис. 4.1.14).

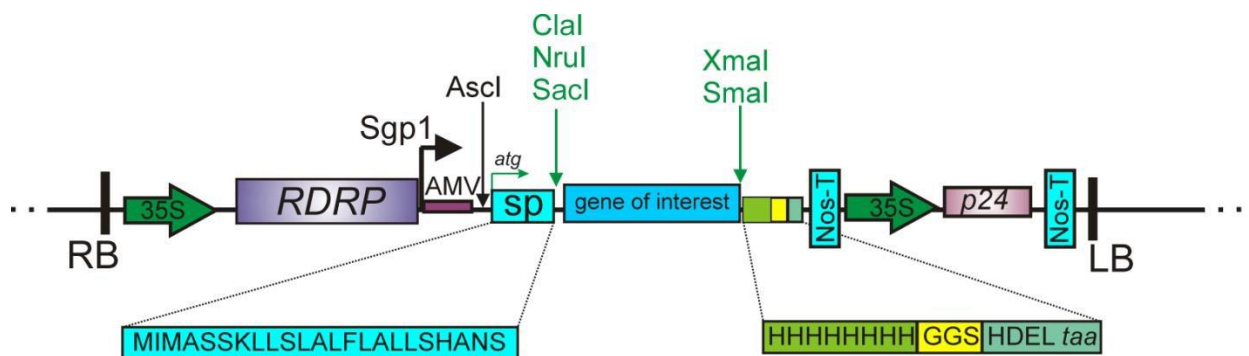


Рисунок 4.1.14. Схема экспрессионного вектора pAeff. Показана область Т-ДНК рекомбинантного бинарного вектора: RDRP – РНК зависимая РНК полимераз ХБК; Sgp1 – первый субгеномный промотор ХБК. 35S – промотор РНК вируса мозаики цветной капусты, Nos-T –терминатор, p24 – ген супрессора сайленсинга, SP – сигнальный пептид. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

Расположение гистидинового тага может оказывать влияние на эффективность очистки целевого белка с помощью металл-аффинной хроматографии. Последовательность 8 гистидинов отделена от HDEL линкером GGS.

В результате нами была получена серия экспрессионных векторов для продукции рекомбинантных белков в растениях (Рис. 4.1.15).

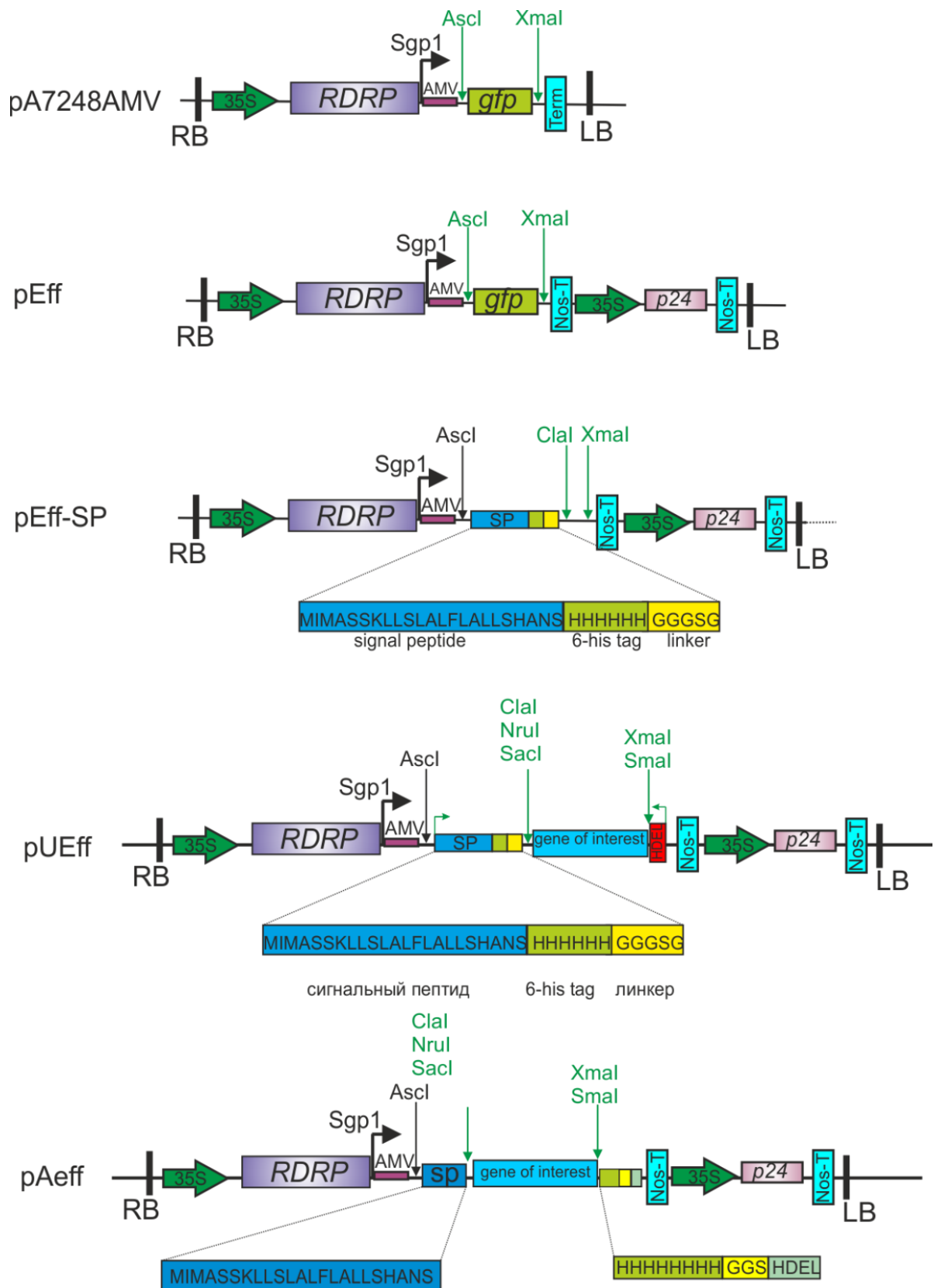


Рисунок 4.1.15. Схема экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля, полученных в данной работе.

## Методы переноса экспрессионных векторов в растительные ткани

В настоящее время используются два основных метода введения агробактерий *A. tumefaciens* в ткани растений: инфильтрация с помощью шприца и крупномасштабная инфильтрация использованием вакуума.

Помимо инфильтрации растений агробактериями с помощью шприца нами был опробован метод введения фитовирусных векторов в растительные клетки с помощью вакуумной агроинфильтрации на примере вирусного вектора pEff-GFP, кодирующего ген зеленого флуоресцентного белка, *gfp*.

Для этого использовали вакуумный насос и эксикатор. В емкость с агробактериями ( $OD_{600} \sim 0,2$ ) помещали растение листьями вниз, затем в эксикаторе создавали разрежение с помощью вакуумного насоса. Достаточным является давление в 200 – 400 мбар. Давление создается на 1 мин, затем воздух медленно выпускается. Данная процедура повторяется дважды. Затем растение инкубировали 3-4 дня в обычных условиях. Схема вакуумной инфильтрации представлена на рис. 4.1.16).

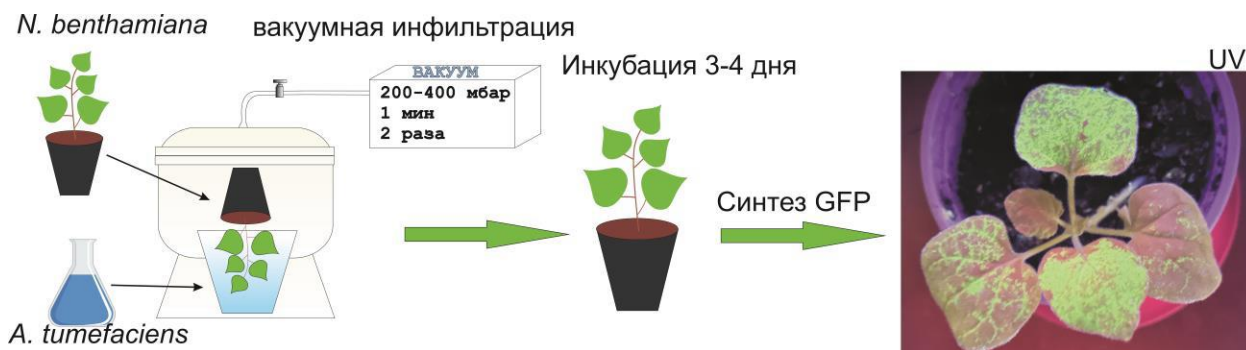


Рисунок 4.1.16. Схема вакуумной инфильтрации на примере вектора pEff-GFP.

Вакуумная инфильтрация обеспечивает эффективное проникновение агробактерий в растительные клетки, что, в итоге, обуславливает синтез целевого продукта на высоком уровне. Данный способ позволяет масштабировать экспрессию в растениях.

#### **4.2. Разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе М2е пептида, присоединенного к ядерному антигену вируса гепатита В.**

Грипп представляет собой острое вирусное заболевание человека, характеризующееся поражением респираторного тракта, лихорадкой, общей интоксикацией, нарушением деятельности сердечно-сосудистой и нервной систем. Поверхностные антигены – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА) – являются целью для иммунной системы. В настоящее время лицензированы вакцины от гриппа, которые вызывают защитный ответ, направленный в основном на вирусные НА и НА. Ввиду высокой изменчивости этих белков, вакцины от гриппа обновляются ежегодно.

Актуальной задачей является создание универсальной вакцины. В состав такой вакцины должны входить высококонсервативные эпитопы вирусных частиц, которые присутствуют во всех популяциях вируса гриппа.

Основой для создания универсальной вакцины может быть внешний домен трансмембранного белка М2 (М2е). Его последовательность (23 аа) практически не меняется во всех человеческих изолятах с 1933 года, а у недавно появившихся штаммов животного происхождения она отличается всего несколькими аминокислотами. Использование М2е пептида в качестве основы противогриппозной вакцины ограничивается его низкой иммуногенностью. Для повышения иммуногенности используются различные носители и адъюванты. Мы использовали в качестве носителя М2е пептида ядерный антиген вируса гепатита В. Экспрессия осуществлялась в растениях *N. benthamiana*.

*Создание фитовирусных векторов, для экспрессии гибридного белка, содержащего ядерный антиген вируса гепатита В (НВс) и М2е пептид вируса гриппа А.*

Последовательность М2ер штамма A/Duck/Potsdam1402-6/1986 (H5N2) была присоединена на N-конец НВс. Последовательность химерного гена

M2epHBc была оптимизирована для экспрессии в *N. benthamiana* и синтезирована *in vitro*. Синтезированная последовательность содержала на концах сайты клонирования *AscI* / *SmaI*.

Для экспрессии гибридного белка M2epHBc использовали векторы pA7248AMV [Ravin *et al.*, 2012] и pEff [Mardanova *et al.*, 2017]. Синтетический ген клонировали в эти векторы, в результате были получены рекомбинантные векторы pA7248AMV-M2epHBc и pEff-M2epHBc (рис. 4.2.1).

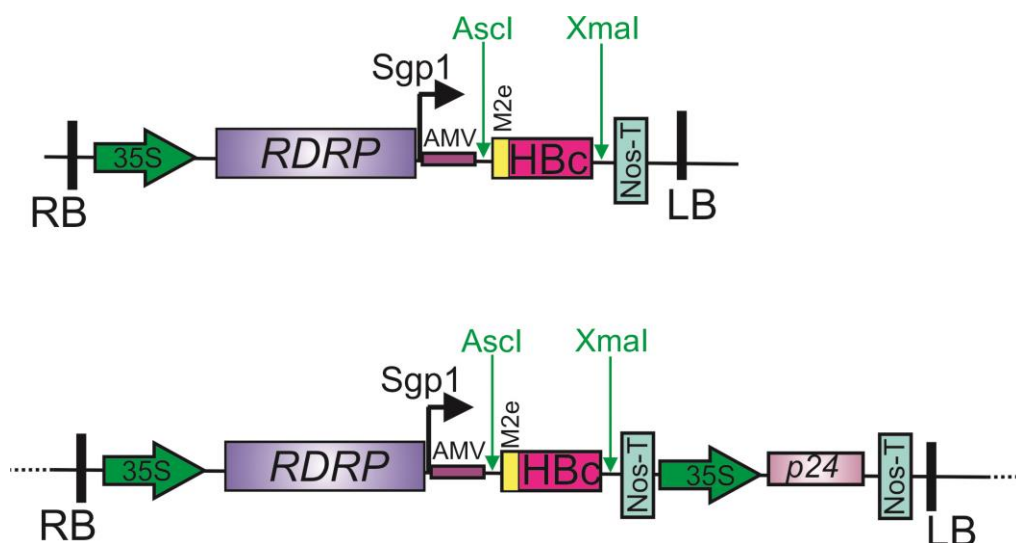


Рисунок 4.2.1. Схема вирусных векторов pA7248AMV-M2epHBc и pEff-M2epHBc. Показана T-ДНК область бинарного вектора. 35S – промотор, Nos-T – терминатор; RDRP – РНК-зависимая РНК-полимераза ХВК; Sgp1 – субгеномный промотор гена транспортного белка 25К ХВК; AMV – лидерная последовательность РНК 4 вируса мозаики люцерны; HBc – ядерный антиген вируса гепатита В; M2e – внеклеточный домен М2 белка вируса гриппа А A/Duck/Potsdam1402-6/1986 (H5N2); LB и RB – левая и правая границы T-ДНК.

*Экспрессия гибридного белка M2epHBc в N. benthamiana с использованием вектора pA7248AMV.*

Полученный вектор pA7248AMV-M2epHBc переносили в *A. tumefaciens* GV3101. Экспрессионный вектор вводили в клетки *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации. Для подавления вирус индуцированного ген-сайленсинга одновременно листья растений коинфильтровали агробактериями, содержащими вектор pBIN\_P19 –

продуцент белка супрессора Р19. Растения выращивали в течение 4–6 дней, затем собирали листья и выделяли белковые препараты.

Полученные препараты анализировали методом вестерн блоттинга с использованием антител против М2е пептида и против НВс антигена (рис. 4.2.2). Было установлено, что белок М2ерНвс эффективно экспрессируется в клетках растения, является растворимым. Выход целевого продукта составляет 1-2% от растворимой фракции белков.

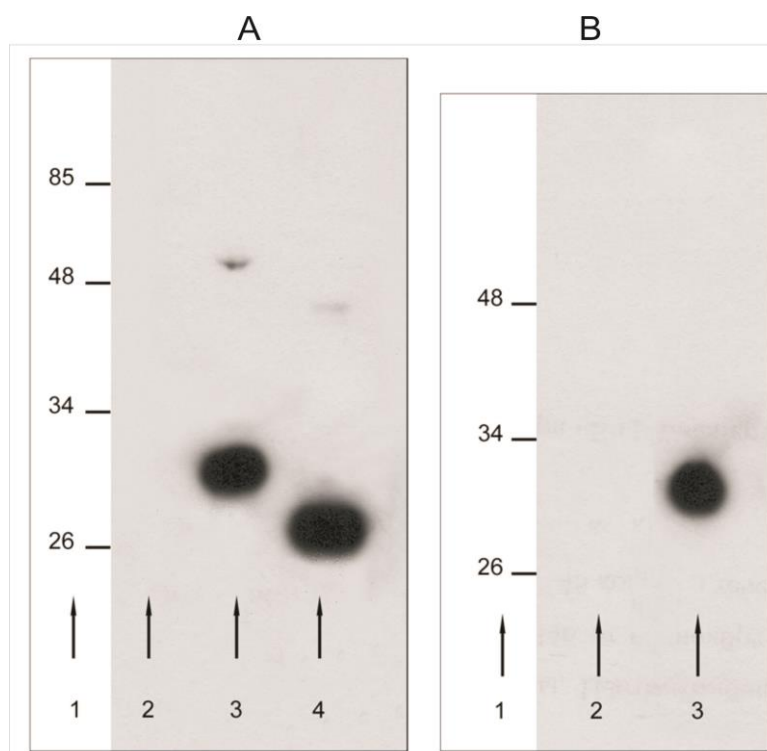


Рисунок 4.2.2. Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов рекомбинантного белка М2ерНвс. (А) Использовались моноклональные антитела на Нвс белок. (В) Использовались моноклональные антитела на М2. 1, маркер молекулярного веса (kDa), 2, растворимая фракция белков, выделенная из неинокулированных листьев, 3, растворимая фракция белков, выделенных из листьев, инокулированных вектором рА7248АМV-М2ерНВс, 4, стандартный препарат НВс антигена (расчетный вес – 21 kDa). Расчетный вес М2ерНВс составляет 24 kDa.

Экспрессия гибридного белка M2eHBc в *N. benthamiana* с использованием вектора pEff.

Вектор pEff-M2eHBc переносили в клетки *A. tumefaciens* LBA44404. Экспрессионный вектор вводили в клетки *N. benthamiana* с помощью агроинfiltrации. Образцы белка были выделены через 5 дней после infiltration и проанализированы с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга (рис. 4.2.3). Наши результаты показывают, что система экспрессии pEff обеспечивает уровни экспрессии M2eHBc около 5-10% от общего растворимого белка, что в несколько раз выше, чем было получено с использованием вектора pA7248AMV или нереплицирующейся системы экспрессии pEAQ-HT [Thuenemann *et al.*, 2013].

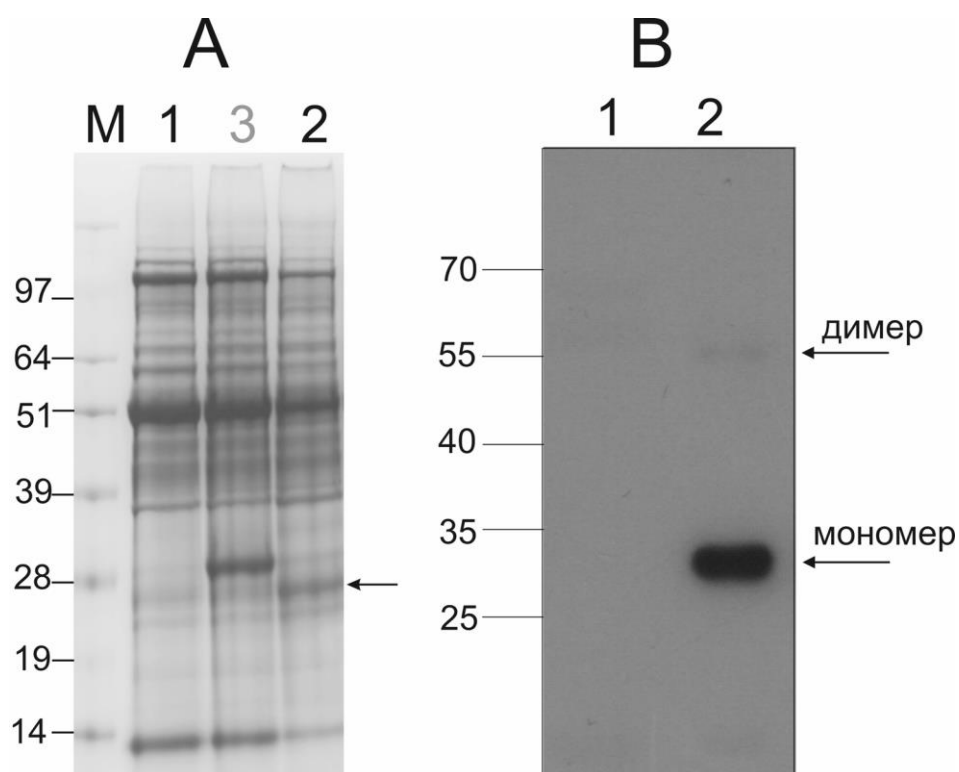


Рисунок 4.2.3. SDS-PAGE (A) и вестерн блоттинг (B) белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (kDa); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинfiltrированного листа; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, infiltrированного pEff-M2eHBc; 3, препарат суммарного белка, выделенного из листа, infiltrированного pEff-GFP (контроль экспрессии).



### Очистка вирусоподобных M2epHBc частиц.

Вирусоподобные M2epHBc частицы, образованные *in vivo* в растениях, выделяли из растительной ткани методом осаждения сульфатом аммония. Степень очистки целевого белка составила около 90%.

Белковый комплекс, образуемый M2epHBc, по плавучей плотности отличается от растворимых растительных белков и при ультрацентрифугировании в основном присутствует в «тяжелых» фракциях градиента. Это указывает на то, что M2eHBc выделяется из растений - продуцентов в виде вирусоподобных частиц (рис. 4.2.4). Данные Вестерн блоттинга свидетельствуют о специфическом связывании M2epHBc как в виде мономера, так и в виде мультимеров с моноклональными антителами против M2e пептида.

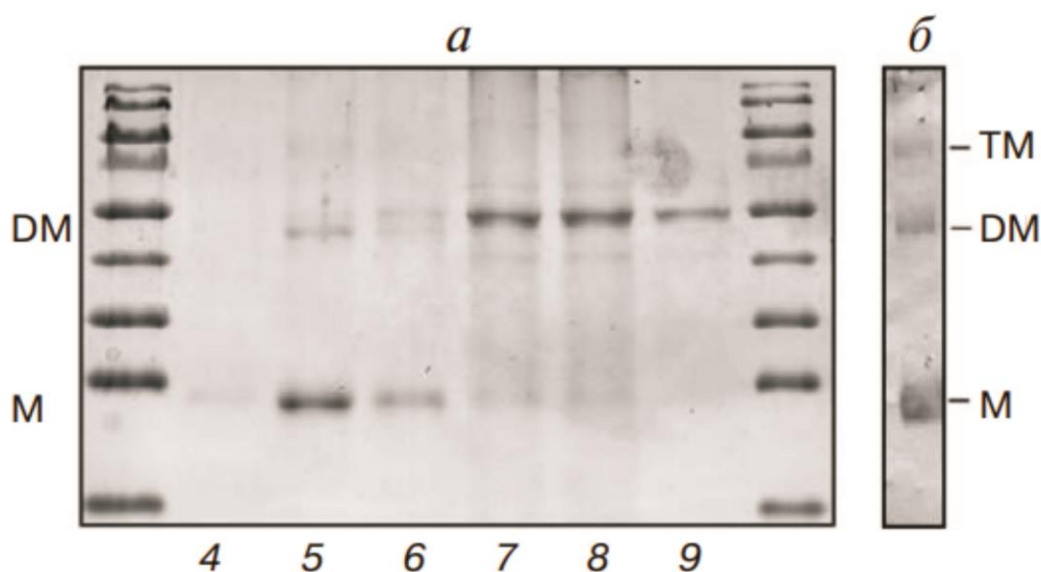


Рисунок 4.2.4. (а) SDS-PAGE белковых препаратов M2epHBc, фракционированных ультрацентрифугированием. На дорожки нанесены препараты из различных фракций градиента плотности, от максимальной до минимальной (4–9). Указаны положения мономера (M) и димера (DM) M2epHBc, полоса большей массы во фракциях 7–9 соответствует растительной рибулозбифосфаткарбоксилазе. (б) Вестерн блоттинг белкового препарата из фракции 5, детекция моноклональными антителами на M2e пептид. Указаны положения мономера (M), димера (DM) и тримера (TM) M2epHBc.

### Структурная характеристика вирусоподобных M2epHBc частиц.

Структуру образованных в растениях вирусоподобных частиц М2ерНВс анализировали с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии. На рисунках 4.2.5 и 4.2.6. представлены результаты анализа частиц, полученных в экспериментах с использованием векторов рА7248АМV-М2ерНВс и рEff-М2ерНВс, соответственно.

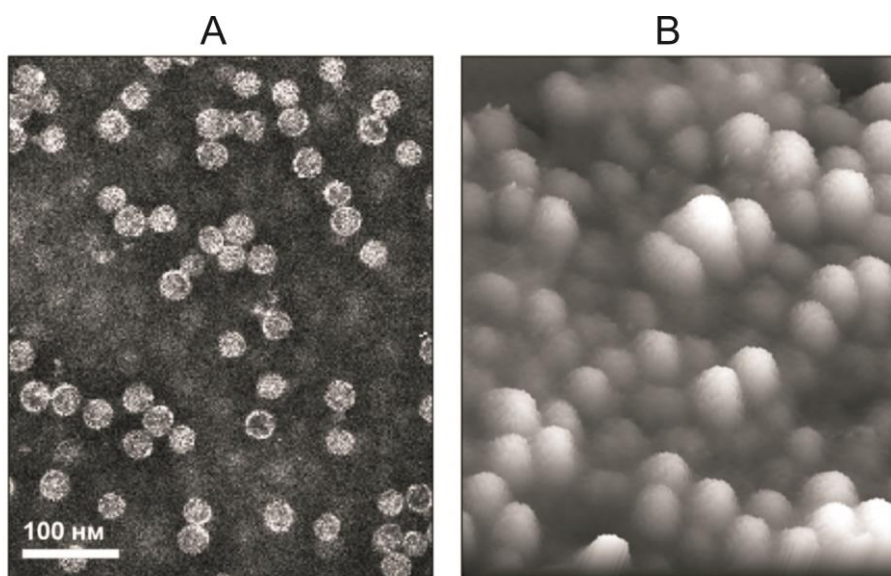


Рисунок 4.2.5. Анализ структуры М2ерНВс частиц с помощью электронной (А) и атомно-силовой (В) микроскопии. Экспрессия с использованием вектора рА7248АМV-М2ерНВс. Использовали просвечивающий электронный микроскоп JEM 1011 (JEOL, Япония), для атомно-силовой микроскопии использовали микроскоп INTEGRA (NT-MDT).

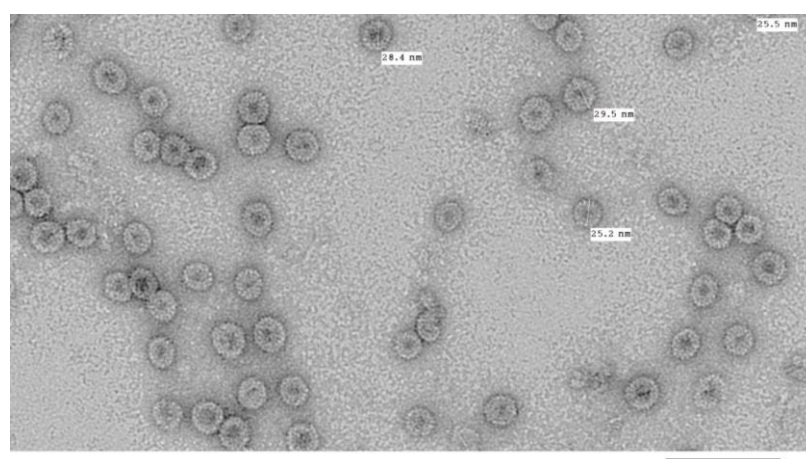


Рисунок 4.2.6. Анализ структуры М2ерНВс частиц. Использовали просвечивающий электронный микроскоп FEI Теснаі 20. Экспрессия с использованием вектора рEff-М2ерНВс.

Анализ подтвердил факт сборки гибридных белков M2ерНВс в наноразмерные вирусоподобные частицы диаметром ~30 нм. Частицы гомогенны по размеру и имеют сферическую форму.

*Иммуногенность и протективное действие полученных в растениях вирусоподобных M2ерНВс частиц.*

Для оценки иммуногенности и протективного действия белка M2ерНВс в качестве кандидаткой вакцины против вируса гриппа А в НИИ Гриппа Минздрава РФ были проведены эксперименты на лабораторных животных.

Валб/с мыши (16–18 g) были иммунизированы препаратами M2ерНВс частиц и PBS в качестве контроля. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно трижды с интервалом две недели с применением для первого введения вакцины адъюванта Sigma system Adjuvant («Sigma»), а для двух последующих иммунизаций – неполного адъюванта Фрейнда («Sigma»). Доза вводимого препарата составляла 20 мкг при первой иммунизации, 50 мкг при последующих.

Сыворотки собирали через 2 недели после второй и третьей иммунизации, титры антител определяли в трех пулах сывороток мышей (по 3–4 мыши в каждом пуле) в опытной и контрольной группах. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированных мышей, а как положительный контроль – моноклональные антитела к M2е штамма A/Duck/Potsdam/1402-6/1986(H5N2), которые были предоставлены П.Г. Свешниковым (ОАО ВНЦМДЛ).

Для проведения ИФА использовали синтетические пептиды G-11-1 и G-19, последовательности которых соответствовали M2е вируса гриппа птиц штаммов A/Chicken/Kurgan/05/2005 и A/Duck/Potsdam1402-6/1986. Полученные результаты (таблица 4.2.1) показывают, что после трехкратной иммунизации в высоких титрах образуются сывороточные антитела изотипа IgG, связывающиеся как с синтетическим пептидом G19, последовательность которого соответствовала использованному для иммунизации M2ер, так и с

пептидом G-11-1, последовательность которого соответствовала M2e гетерологичного штамма вируса гриппа А.

Таблица 4.2.1. Титры IgG антител к синтетическим пептидам M2e в сыворотке мышей, иммунизированных M2eрНВс после второй и третьей иммунизации

Сыворотки мышей, иммунизированных M2eрНВс	Титры антител			
	пептид G-11-1		пептид G-19	
	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2a
после 2-ой иммунизации				
пул 1	1600	12800	800	12800
пул 2	3200	25600	1600	12800
пул 3	1600	12800	200	6400
после 3-ей иммунизации				
пул 1	25600	51200	6400	51200
пул 2	25600	51200	6400	51200
пул 3	25600	51200	1600	25600
Сыворотки мышей иммунизированных PBS (контроль)	<200	<200	<200	<200

Для оценки протективного действия вакцины мышей опытной и контрольной групп заражали адаптированным к мышам штаммом вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005. Вирус вводили интраназально в дозе 1 LD50. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными в течение 14 суток. Протективное действие препарата оценивали с помощью двух параметров: определяли динамику уменьшения массы тела и выживаемости мышей после заражения (рис. 4.2.7-8).

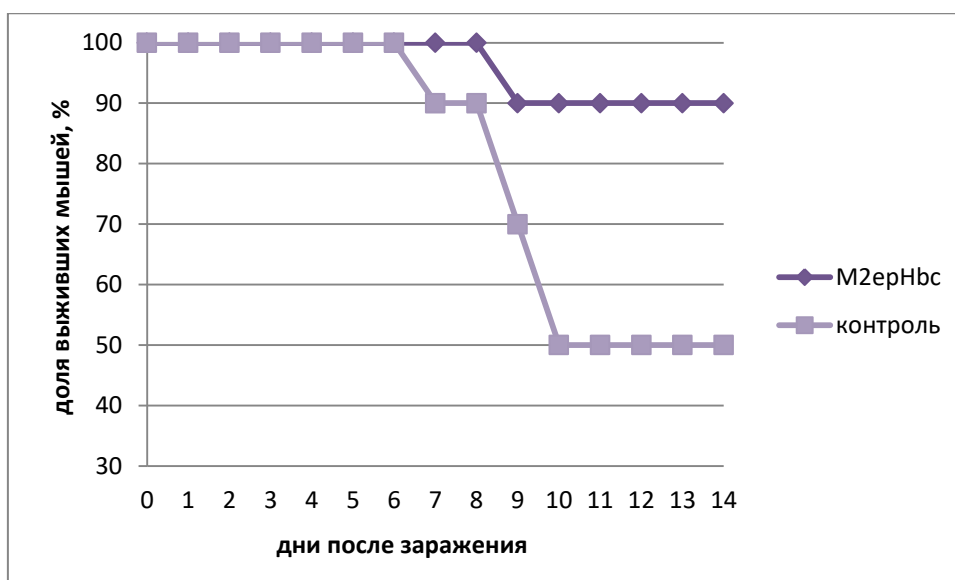


Рисунок 4.2.7. Протективное действие препарата частиц M2epHbc. Динамика гибели мышей после заражения 1 x LD50 вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005.

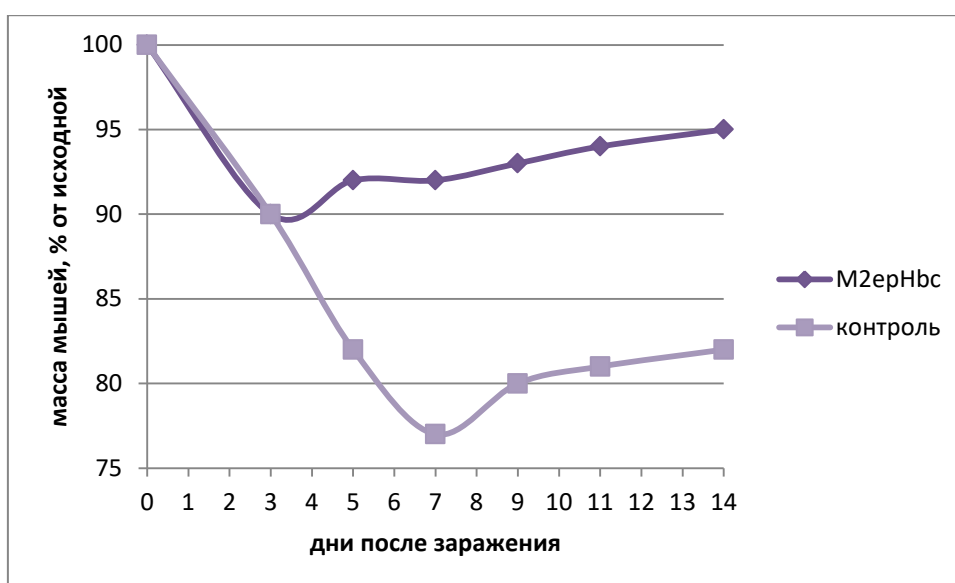


Рисунок 4.2.8. Протективное действие препарата частиц M2epHbc. Изменение средней массы тела выживших мышей после заражения 1x LD50 вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005.

Динамика изменения массы тела животных после заражения является показателем тяжести протекания заболевания. После инфекции масса иммунизированных животных снижалась в значительно меньшей степени (до 90% начальной), чем у выживших мышей контрольной группы (до 77%

начальной). Эти результаты показывают, что иммунизация кандидатной вакциной существенно облегчает протекание инфекции.

Динамика гибели мышей после заражения птичьим штаммом гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005 свидетельствует о 90% протективном действии M2eНВс. В контрольной группе мышей при этих условиях заражения выжило лишь 50% животных.

### *Заключение*

Таким образом, гибридный белок M2eНВс эффективно синтезируется в *N. benthamiana*. Эффективность экспрессии существенно зависит от используемого экспрессионного вектора. Так при экспрессии с использованием вектора pA7248AMV-M2eНВс эффективность составила 1 – 2 % от суммарного растворимого белка, в то время как при использовании улучшенного вектора pEff-M2eНВс эффективность была уже 5 – 10%. В зависимости от системы экспрессии M2eНВс образует вирусоподобные частицы сферической формы и размером ~ 30 nm. Иммунизация мышей M2eНВс частицами вызывает эффективный иммунный ответ против M2e и обеспечивает формирование протективного иммунитета против летальной гриппозной инфекции.

### 4.3. Разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе М2е пептида, присоединенного к бактериальному флагеллину.

В данном разделе в качестве адьюванта-носителя М2е пептида использован флагеллин бактерии *Salmonella typhimurium*. Этот белок обладает выраженными адьювантными свойствами, так как является лигандом толл-подобного рецептора 5 (TLR5) и через адаптерный белок MyD88 активирует клетки CD4+ и дальнейшую индукцию синтеза специфических иммуноглобулинов. Флагеллин является мукозальным адьювантом, что позволяет вводить гибридные белки на его основе интраназально.

*Дизайн и синтез генов, кодирующих гибридные белки, содержащие флагеллин и М2е пептиды вируса гриппа А.*

В качестве основы противогриппозной вакцины мы использовали флагеллин *Salmonella typhimurium* с 4 копиями М2е белка вируса гриппа А.

Последовательность гена флагелина получали с помощью ПЦР с использованием праймеров FlgBH\_F и FlgBH\_R. В качестве матрицы использовали геномную ДНК бактерий *Salmonella typhimurium*. Четыре копии М2е пептида гриппа А были включены на С конец флагелина. Использовали консенсусную последовательность М2е пептида из вируса гриппа А человека (М2еh) и М2е вируса гриппа птиц А/Chichen/Kurgan/05/2005 (М2еk), по две копии каждого (М2еh-М2еk- М2еh-М2еk). Последовательности М2е пептидов разделяли линкерными последовательностями. Нуклеотидную последовательность, кодирующую четыре копии М2е, разделенные линкерами, получали синтетически. Последовательность гена флагелина с 4М2е объединяли во вспомогательном векторе (pQE30) [Tsybalova *et al.*, 2018]. Дополнительно на N-конце белка находилась последовательность 6 остатков гистидина. В

результате был получен вектор p-Flg-4M, кодирующий гибридный белок Flg-4M, состоящий из флагеллина и четырех копий M2e пептида (рис. 4.3.1).

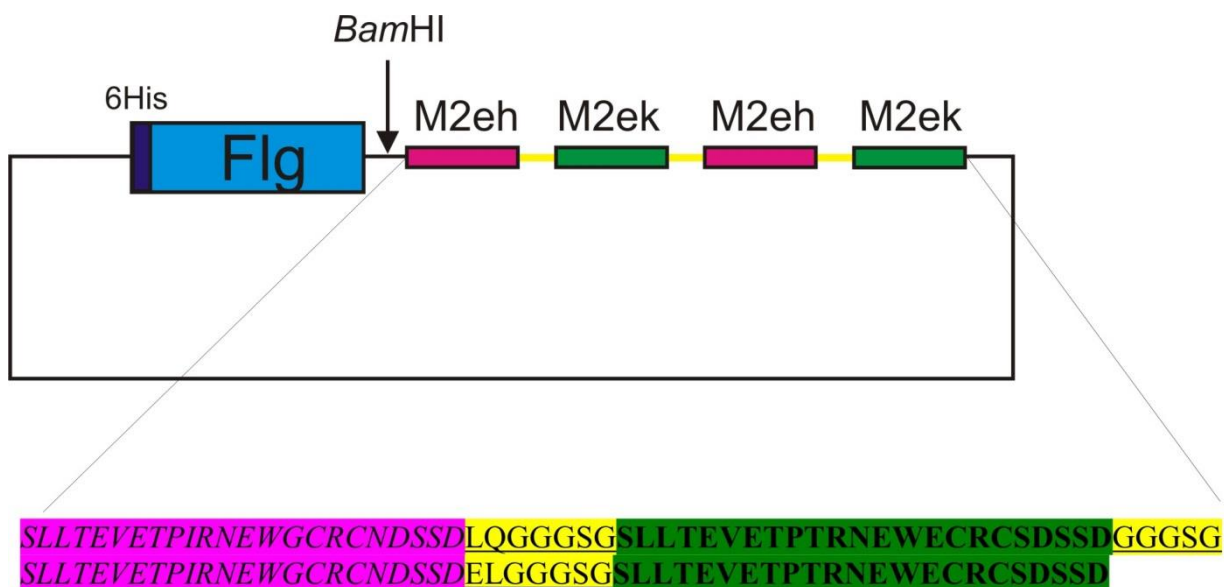


Рисунок 4.3.1. Схема вектора p-Flg-4M. Flg – последовательность, кодирующая флагеллин *Salmonella typhimurium*; 6His – последовательность шести остатков гистидина; M2eh – консенсусная последовательность M2e пептида вирусов гриппа человека [выделена курсивом]; M2ek – последовательность M2e пептида вируса гриппа птиц [выделена жирным шрифтом] (A/Chichen/Kurgan/05/2005 (H5N1)). Последовательности линкеров подчеркнуты. В нижней части рисунка приведена аминокислотная последовательность участка гибридного белка с M2e пептидами.

#### Создание фитовирусных векторов для экспрессии в растениях гибридного белка Flg-4M.

Для создания экспрессионного вектора последовательность Flg-4M2e (включая 6his) получали с помощью ПЦР с праймерами AscI-Flg-F и M2K-SmaI-R. В качестве матрицы использовали вспомогательную плазмиду p-Flg-4M. Полученный ПЦР фрагмент был клонирован в векторе pA7248AMV с использованием сайтов рестрикции AscI, SmaI. В результате был получен вектор pA7248AMV-Flg-4M (рис. 4.3.2).

Параллельно последовательность гена Flg-4M2e была клонирована в векторе pEAQ-HT [Sainsbury *et al.*, 2009], основанном на геноме вируса



мозаики коровьего гороха (cowpea mosaic virus, CPMV). В отличие от рA7248AMV, вектор рEAQ-НТ не способен к репликации в клетках растений, а высокая эффективность экспрессии достигается за счет присутствия в нем 5' и 3' нетранслируемых областей вируса мозаики коровьего гороха, стабилизирующих РНК и обеспечивающих ее эффективную трансляцию.

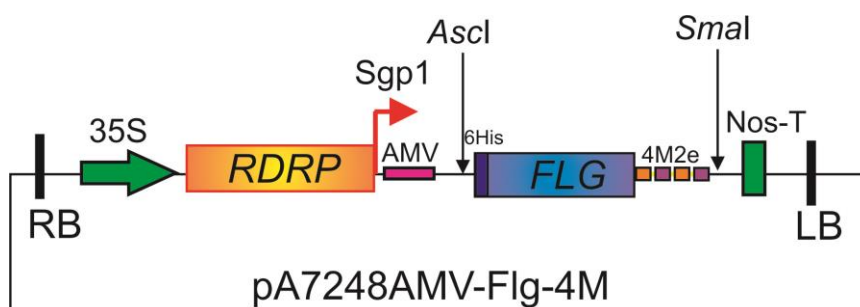


Рисунок 4.3.2. Схема вирусного вектора рA7248AMV-Flg-4M. Показана Т-ДНК область бинарного вектора.

Для клонирования в данный вектор получали ПЦР-фрагмент Flg-4M2e с помощью праймеров NruI-Flg-F, M2K-AvaI-R. В результате был получен экспрессионный вектор рEAQ-Flg-4M (рис. 4.3.3). Данный вектор дополнительно кодирует супрессор сайленсинга P19.

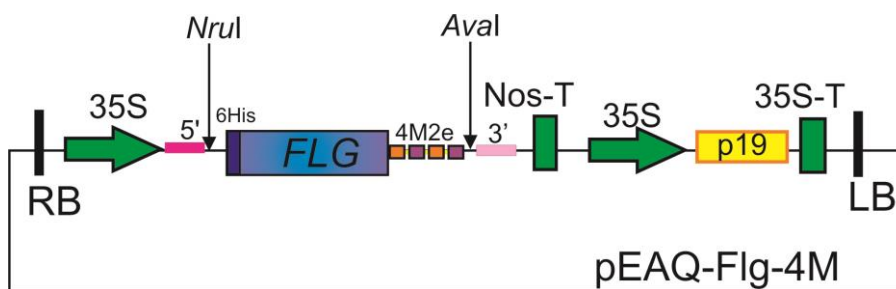


Рисунок 4.3.3. Схема вектора рEAQ-Flg-4M. Показана Т-ДНК область бинарного вектора. 35S – промотор, 35S-T – терминатор РНК вируса мозаики цветной капусты; Nos-T – терминатор транскрипции Nos; 6His – последовательность шести остатков гистидина; Flg-4M2e – последовательность, кодирующая гибридный белок, состоящий из флагеллина и четырех копий M2e белка; 5' – 5'-нетранслируемая область вируса мозаики коровьего гороха; 3' – 3'-нетранслируемая область вируса мозаики коровьего гороха; p19 – последовательность, кодирующая супрессор сайленсинга P19; LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

*Экспрессия гибридного белка Flg-4M в растениях Nicotiana benthamiana.*

Полученные экспрессионные векторы переносили в клетки растений с помощью агроинfiltrации. Листья *N. benthamiana* инfiltrировали равными количествами агробактерий, содержащими рекомбинантные векторы pA7248AMV-Flg-4M и pEAQ-Flg-4M. Растения выращивали в течение четырех дней, после чего из зон агроинfiltrации выделяли препараты белков. Полученные белковые препараты анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против M2e пептида.

Поскольку в отличие от pEAQ вектор pA7248AMV не содержал кассету экспрессии супрессора посттранскрипционного ген-сайленсинга, дополнительно в клетки растений вводили агробактерии, содержащие вектор – продуцент супрессора P24. Таким образом, всего использовали четыре варианта экспрессионных конструкций:

- 1—pA7248AMV\_Flg-4M;
- 2—pEAQ-Flg-4M;
- 3—pA7248AMV\_Flg-4M вместе с продуцентом P24;
- 4—pEAQ-Flg-4M вместе с продуцентом P24.

На одном листе находились одновременно зоны заражения для четырех вариантов экспрессионных конструкций (Рис. 4.3.4).

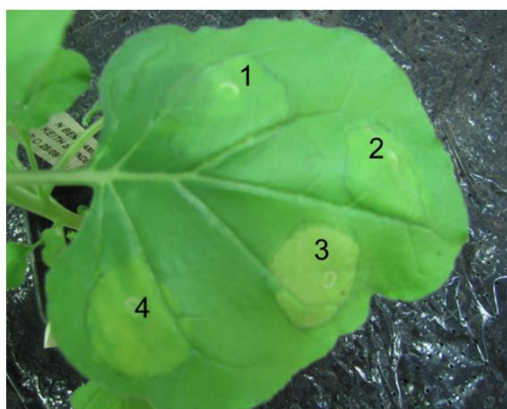


Рисунок 4.3.4. Лист растения *N. benthamiana*, инfiltrированный агробактериями: 1—pA7248AMV\_Flg-4M; 2—pEAQ-Flg-4M; 3—pA7248AMV\_Flg-4M + продуцент P24; 4—pEAQ-Flg-4M + продуцент P24.

Растения выращивали в течение 3–7 дней. В течение данного срока из зон агроинфильтрации каждый день выделяли белковые препараты (по 3 листа). Полученные препараты анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием антител против М2е. В качестве отрицательного контроля использовали неинфильтрованные листья растения *N. benthamiana*. Результаты вестерн-блот анализа белков, выделенных на 3, 4, 5, 6 и 7 дни, представлены на рисунках 4.3.5 - 4.3.9.

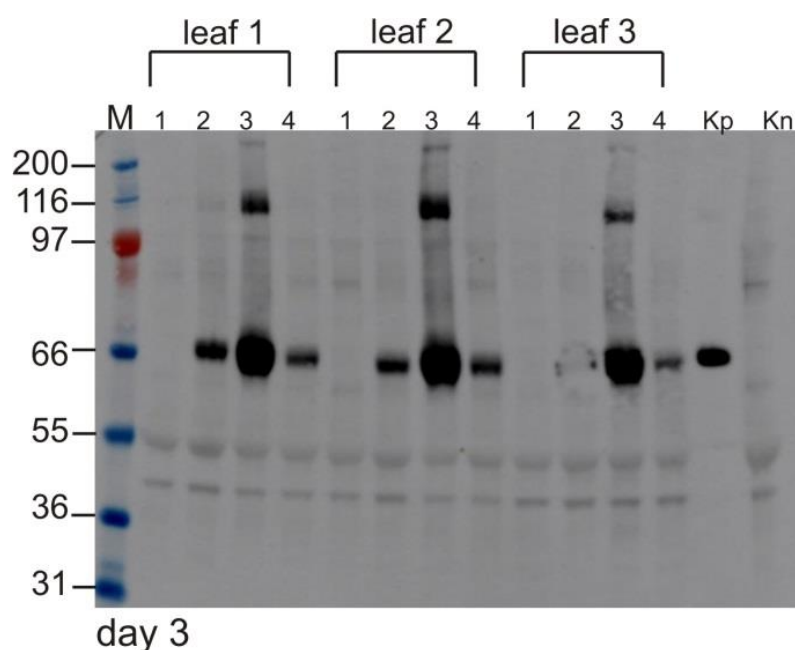


Рисунок 4.3.5. Вестерн-блот анализ белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов через 3 суток после заражения. М – маркер молекулярного веса (kDa); 1 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M; 2 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M; 3 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; 4 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; Kp – стандартный препарат Flg-4M; Kn – препарат растворимых белков из неинокулированных листьев *N. benthamiana*.

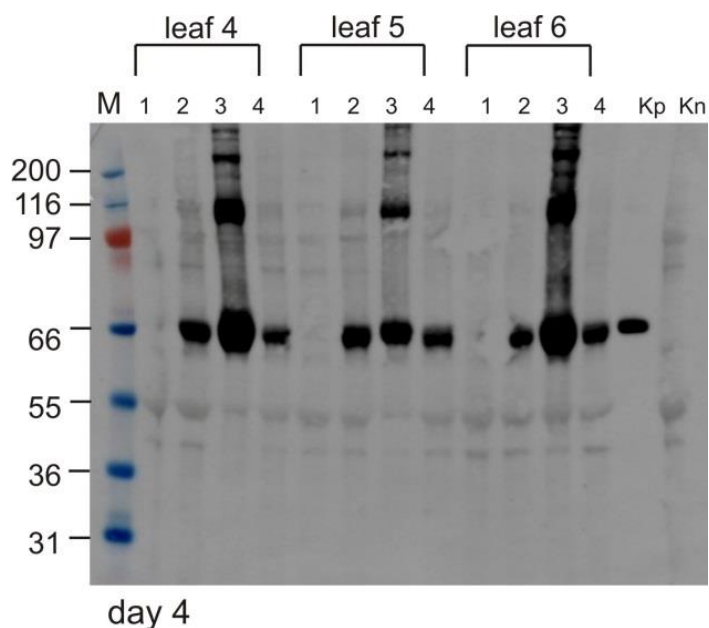


Рисунок 4.3.6. Вестерн-блот анализ белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов через 4 суток после заражения. М – маркер молекулярного веса (кДа); 1 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M; 2 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M; 3 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; 4 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; Кр – стандартный препарат Flg-4M; Кн – препарат растворимых белков из неинокулированных листьев *N. benthamiana*.

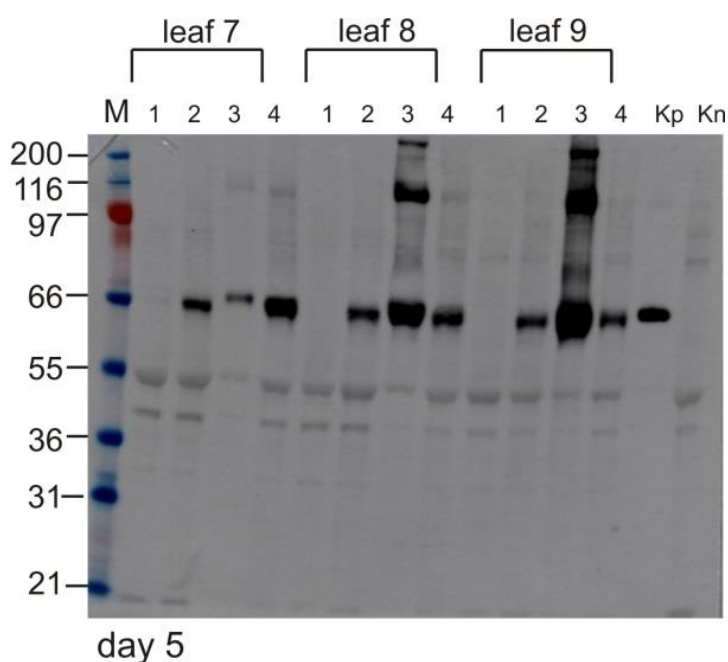


Рисунок 4.3.7. Вестерн-блот анализ белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов через 5 суток после заражения. М – маркер молекулярного веса (kDa); 1 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M; 2 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M; 3 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; 4 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; Кр – стандартный препарат Flg-4M; Кп – препарат растворимых белков из неинокулированных листьев *N. benthamiana*.

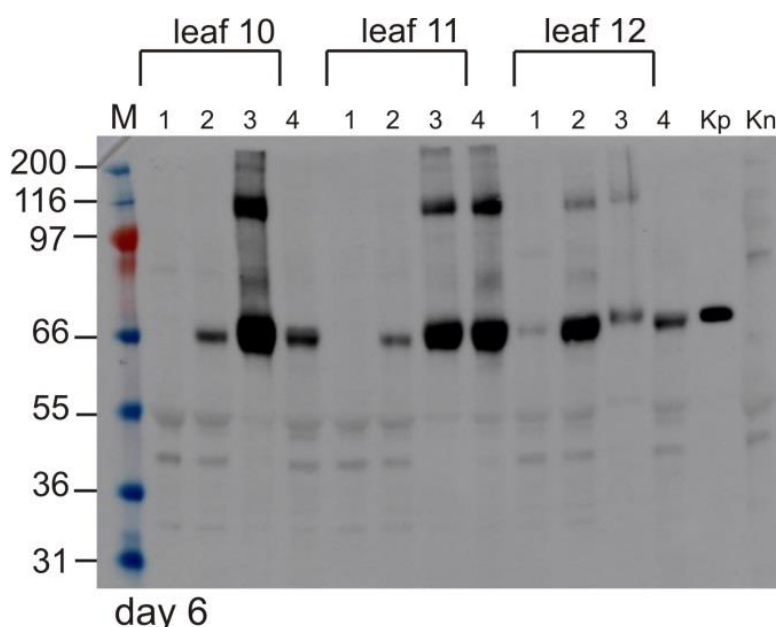


Рисунок 4.3.8. Вестерн-блот анализ белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов через 6 суток после заражения. М – маркер молекулярного веса (kDa); 1 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M; 2 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M; 3 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором pA7248AMV-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; 4 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором pEAQ-Flg-4M совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24; Кр – стандартный препарат Flg-4M; Кп – препарат растворимых белков из неинокулированных листьев *N. benthamiana*.

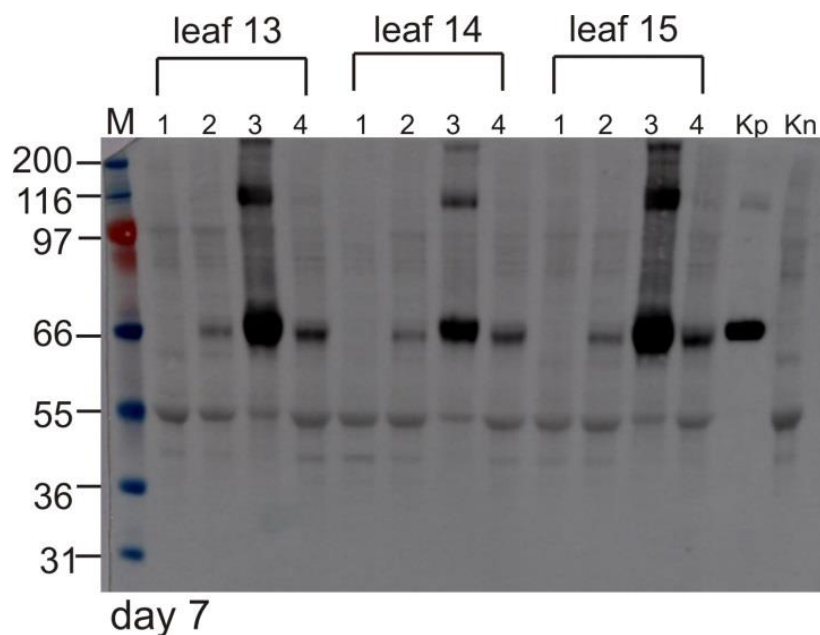


Рисунок 4.3.9. Вестерн-блот анализ белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов через 7 суток после заражения. М – маркер молекулярного веса (kDa); 1 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором рA7248AMV-Flg-4М; 2 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором рEAQ-Flg-4М; 3 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вирусом-вектором рA7248AMV-Flg-4М совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга Р24; 4 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных вектором рEAQ-Flg-4М совместно с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга Р24; Кр – стандартный препарат Flg-4М; Кп – препарат растворимых белков из неинокулированных листьев *N. benthamiana*.

Для каждого дня результаты вестерн-блот анализов суммировали по трем листьям. Для этого определяли интенсивность полос, соответствующих белку Flg-4М. В качестве референсной использовали полосу, соответствующую стандартному препарату Flg-4М. На рис. 4.3.10 представлены суммарные результаты вестерн-блоттинга.



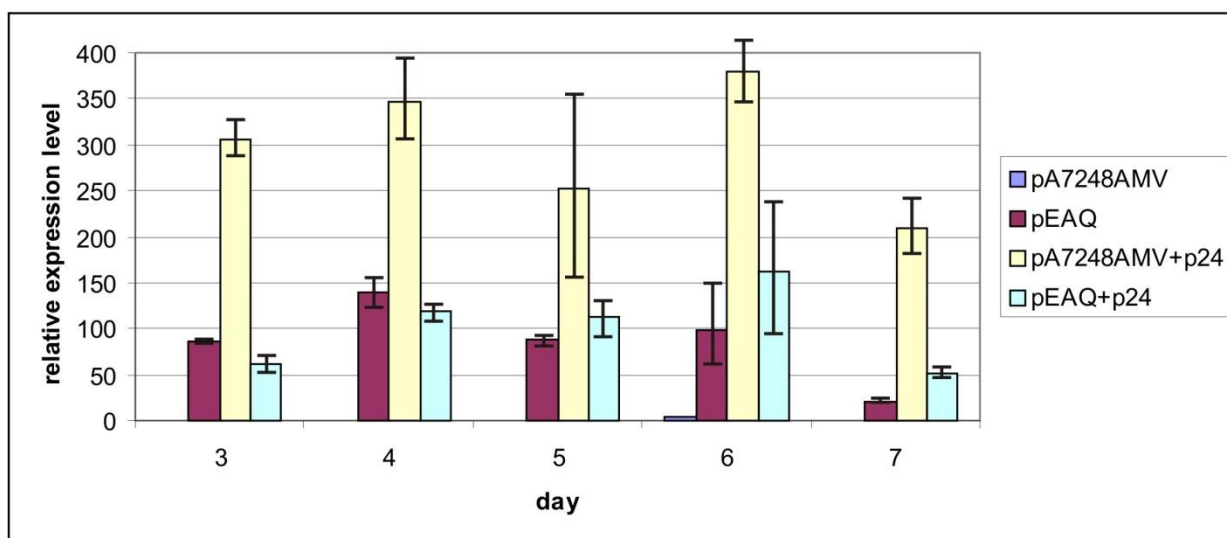


Рисунок 4.3.10. Динамика экспрессии белка Flg-4М в растениях. Приведена диаграмма, отображающая суммарные результаты вестерн-блоттингов белковых препаратов с 3 по 7 день после агроинfiltrации растений исследуемыми векторами.

По данным результатам можно сделать вывод, что в случае экспрессионного вектора pA7248AMV-Flg-4М гибридный белок практически не синтезировался. В случае же его коинfiltrации с вектором – продуцентом супрессором сайленсинга P24, уровень экспрессии белка Flg-4М значительно повышался. Также следует отметить, что начиная с пятого дня после заражения в некоторых зонах листьев растений, инfiltrированных векторами pA7248AMV-Flg-4М вместе с продуцентом P24, наблюдался некроз тканей. Соответственно, оптимальным периодом для выделения белковых препаратов для данного варианта экспрессионного вектора являются 3-4 сутки после инfiltrации.

В случае вектора pEAQ-NT\_Flg-4М уровень экспрессии целевого гена в независимости от наличия P24 был в несколько раз ниже, чем для пары pA7248AMV-Flg-4М и продуцента P24.

Таким образом, оптимальным вариантом для получения белка Flg-4М является коинfiltrация растений агробактериями, содержащими вектор pA7248AMV-Flg-4М и вектор, кодирующий супрессор сайленсинга P24.

*Препаративная экспрессия и очистка рекомбинантного белка Flg-4M2e из растений N. benthamiana.*

Для наработки ц белка Flg-4M, был выбран вирусный вектор pA7248AMV-Flg-4M, который использовали вместе с вектором, кодирующим супрессор сайленсинга P24.

Растения выращивали в течение четырех дней, после чего из зон агроинфильтрации выделяли препараты белков. Полученные белковые препараты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блот анализа с использованием антител против M2e пептида (рис 4.3.11). Эффективность экспрессии гибридного белка Flg-4M в клетках растения *Nicotiana benthamiana* составила ~ 30% от суммарного растворимо белка, что соответствует ~ 1,2 мг на 1 грамм листьев.

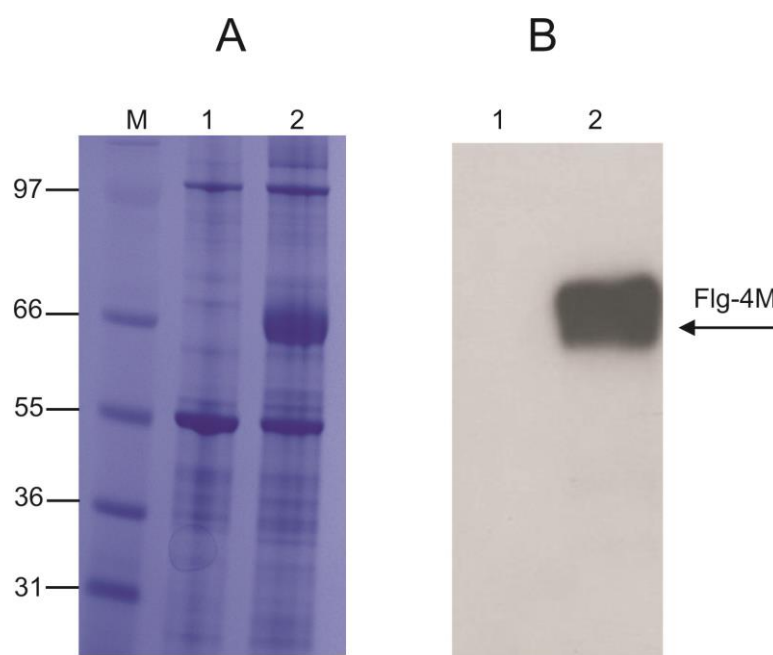


Рисунок 4.3.11. SDS-PAGE (A) и Вестерн-блот анализ (B) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов через 4 суток после заражения. М – маркер молекулярного веса (kDa); 1 – препарат растворимых белков из неинокулированных листьев *N. benthamiana*; 2 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных pA7248AMV-Flg-4M и продуцент P24.

Очистку рекомбинантного белка Flg-4M проводили с помощью металл-аффинной хроматографии с использованием Ni сорбента в денатурирующих



условиях. Полученные белки диализовали против буфера PBS. Диализованный препарат центрифугировали при 100 000 g для удаления агрегатов Rubisco (рис. 4.3.12).

Препарат белка Flg-4M, предназначенный для экспериментов на лабораторных животных был наработан в миллиграммовых количествах (Рис. 4.3.13). Выход очищенного препарата составил 350-400 мг с 1 г листьев *N. benthamiana*. Контрольный препарат белка Flg также был наработан в растительной системе экспрессии аналогично Flg-4M.

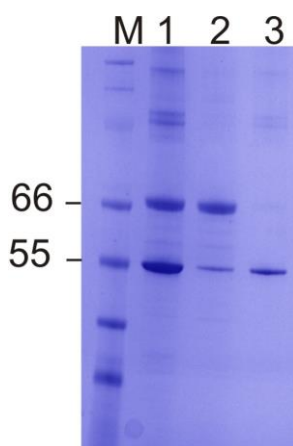


Рисунок 4.3.12. SDS-PAGE анализ очистки препарата Flg-4M. М – маркер молекулярного веса (кДа); 1 – очищенный диализованный препарат Flg-4M до центрифугирования; 2 – очищенный препарат Flg-4M после ультрацентрифугирования; 3 – осадок после ультрацентрифугирования.

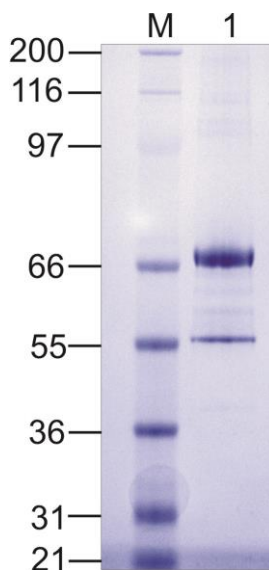


Рисунок 4.3.13. SDS-PAGE анализ очищенного препарата Flg-4M, выделенного из *N. benthamiana*.

### Антигенные свойства полученного в растениях белка Flg-4M.

Доступность M2e пептида в гибридном белке анализировали с помощью ИФА. Для этого планшеты покрывали препаратами Flg и Flg-4M в двукратных разведениях. Затем проводили инкубацию с M2e – специфическими и 6-his – специфическими антителами. Flg и Flg-4M взаимодействовали с 6-his – специфическими антителами, но только Flg-4M взаимодействовал с M2e – специфическими антителами (рис. 4.3.14). Данные результаты свидетельствуют о доступности M2e пептида в белке Flg-4M для антител.

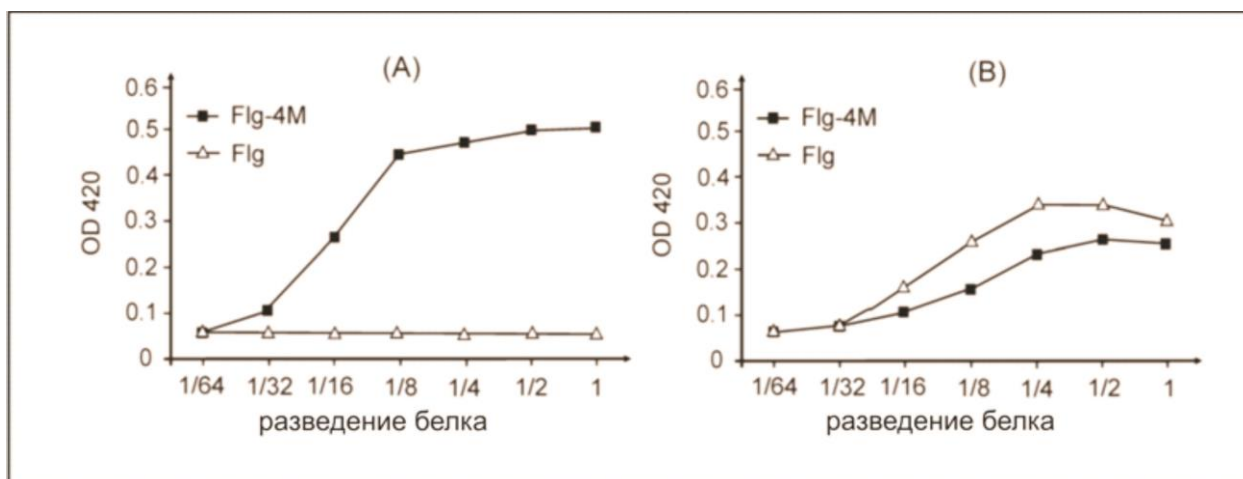


Рисунок 4.3.14. Антигенные свойства белка Flg-4M. Двукратные разведения рекомбинантных белков Flg-4M или Flg (начиная с 30 мкг / мл) наносили на ИФА планшеты, которые затем инкубировали с моноклональными антителами, специфичными для M2e (A) или 6-his тага, присутствующего как в Flg-4M, так и в Flg (B).

Пептиды M2e, при инфекции экспонированные на поверхности инфицированные клетки в виде тетрамеров, имеют тенденцию к агрегации из-за наличия двух остатков цистеина на каждую копию M2e, что приводит к образованию дисульфидной связи. Чтобы контролировать отсутствие агрегации белка Flg-4M, мы проанализировали, как ведет себя очищенный белок при электрофорезе в полиакриламидном геле при добавлении  $\beta$ -меркаптоэтанола в буфер для нанесения белка и без него (reducing и non-

reducing). Рекомбинантный белок Flg-4M мигрировал в ожидаемом положении и детектировался M2e-специфическими моноклональными антителами, что свидетельствует об отсутствии агрегации (рис. 4.3.15). Также высокомолекулярных агрегатов не было обнаружено при электронной микроскопии.

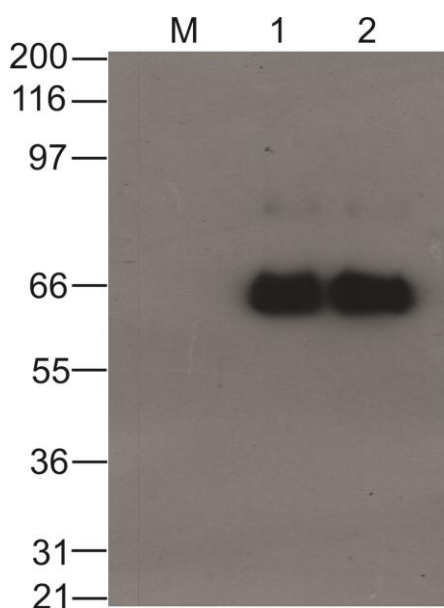


Рисунок 4.3.15. Вестерн-блот анализ очищенного белкового препарата Flg-4M при электрофорезе в полиакриламидном геле без добавления (1) и с добавлением (2)  $\beta$ -меркаптоэтанола в буфер для нанесения. Используются M2e-специфические антитела.

#### *Иммуногенность и протективное действие полученного в растениях белка Flg-4M.*

Для оценки иммуногенности и протективного действия рекомбинантного белка Valb/c мыши были иммунизированы препаратами белков Flg-4M и Flg (контрольный флагеллин без M2e). Дополнительной контрольной группе мышей вводили фосфатно-солевой буфер. Мышей иммунизировали 10  $\mu$ г белка интраназально трижды с двухнедельными интервалами без дополнительных адъювантов. Образцы крови выделяли через 2 недели после третьей иммунизации.

Определение титра сывороточных IgG антител к M2e проводили с помощью ИФА с использованием синтетического пептида G37

(«человеческий» M2e), синтетического пептида G-11-1, последовательность которого соответствуют M2e штамма гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005, а также контрольного флагеллина, выделенного из *N. benthamiana*.

Титры IgG антител после третьей иммунизации определяли в сыворотках крови иммунизированных мышей и в бронхоальвеолярных лаважах (БАЛ). Результаты представлены в таблицах 4.3.1 и 4.3.2. В сыворотках мышей наблюдались высокие титры антител против M2e, уровень которых был даже выше, чем антител против флагеллина. Уровень антител против M2e в БАЛ также был достоверно выше, чем контрольных групп.

Таблица 4.3.1. Титры IgG антител в сыворотках мышей к синтетическим пептидам G-11-1, G-37, и флагеллину после третьей иммунизации

Препарат	Мышь	Иммобилизованный антиген		
		G-37	G-11-1	флагеллин
Flg-4M	1	51 200	25 600	102 400
	2	102 400	25 600	3 200
	3	204 800	102 400	51 200
	4	51 200	25 600	6 400
	5	25 600	12 800	12 800
	среднее геометрическое		67 558	29 406
Flg	1	200	200	-
	2	200	200	-
	3	200	200	-
	4	200	200	-
	5	200	200	-
	среднее геометрическое		200	200
PBS		200	200	

Таблица 4.3.3. Титры IgG антител в БАЛ к синтетическим пептидам G-11-1 и G-37 после третьей иммунизации

Препарат	Мышь	Иммобилизованный антиген	
		G-37	G-1-1
Flg-4M	1	128	128
	2	512	128
	3	2048	256
	4	256	128
	5	128	64
	среднее геометрическое	338	130
Flg	1	8	8
	2	8	8
	3	8	8
	4	8	8
	5	8	8
	среднее геометрическое	8	8
PBS		8	8

На 14-й день после последней иммунизации мышей Balb/c заражали адаптированным к мышам штаммом вируса гриппа человека A/PR/8/34 (H1N1) в дозе  $5 \times LD_{50}$ . После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали по динамике падения массы тела, выживаемости мышей после заражения и снижению репродукции вируса в легких.

Мыши, иммунизированные препаратом Flg-4M, были полностью защищены от заражения вирусом, в то время как мыши иммунизированные Flg или PBS не были защищены (рис. 4.3.16). При заражении фиксировалась масса инфицированных животных (рис. 4.3.17). Снижение массы тела мышей, иммунизированных Flg-4M, было менее выраженным по сравнению с выжившими контрольными животными.

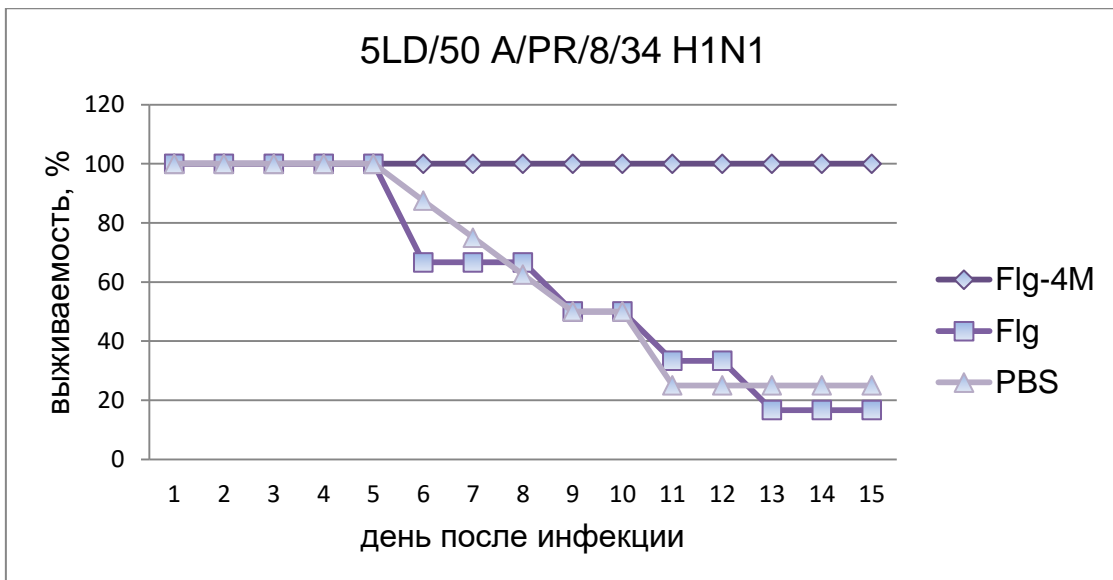


Рисунок 4.3.16. Динамика гибели мышей, иммунизированных рекомбинантными белками Flg-4M, Flg после заражения 5LD/50 вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Достоверное отличие между группами Flg-4M и контрольной группой ( $p \leq 0,05$  Montel-Cox test).

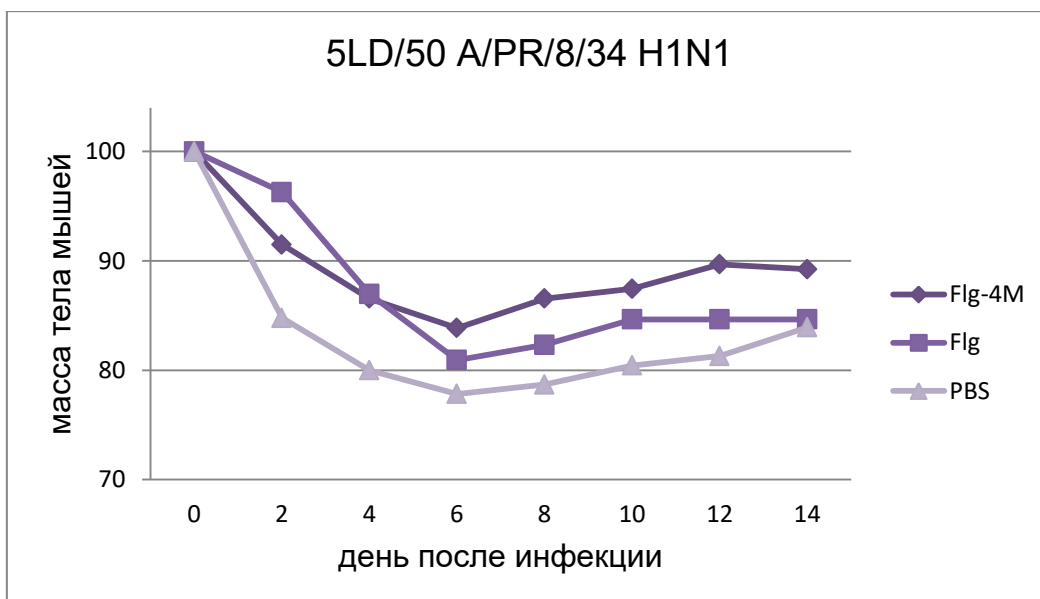


Рисунок 4.3.17. Динамика массы тела мышей, иммунизированных рекомбинантными белками после заражения 5LD/50 вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Достоверное отличие между группами Flg-4M от PBS ( $p \leq 0,05$  Wilcoxon test).

Высокий защитный эффект вакцинных белков подтверждает и быстрое восстановление веса животных, а также существенное снижение на 6-й день болезни титров вируса A/PR/8/34 (H1N1) в легких у мышей

иммунизированных Flg-4M, по сравнению с мышами контрольных групп, иммунизированных Flg или PBS (таблица 4.3.3).

Таблица 4.3.3. Вирусовыделение из легких на 6 сутки после заражения мышей A/PR/8/34 H1N1 в дозе 5LD/50

Препарат	Репродукция в легких, lg ТЦД50
Flg-4M	<b>2.0±1.8*</b>
Flg	6.78±1.57
PBS	5.78±0.39

\*-достоверное отличие от группы 2

### Заключение

Таким образом, мы экспрессировали химерный белок, содержащий бактериальный флагеллин *Salmonella typhimurium*, соединенный с четырьмя тандемными копиями M2e пептида вируса гриппа А в растениях *N. benthamiana*. Использование самореплицирующегося вирусного вектора на основе генома X вируса картофеля позволило достичь очень высокого уровня экспрессии, до 1 мг на грамм листа. Интраназальная иммунизация мышей очищенным вакцинным белком индуцировала высокие уровни M2e-специфических сывороточных антител и обеспечивала защиту против заражения вирусом гриппа. Данный препарат может быть использован в качестве кандидатной «растительной» вакцины от вируса гриппа А, которую можно вводить интраназально.

#### **4.4. Разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида и фрагмента гемагглютинина, присоединенных к бактериальному флагеллину.**

Гемагглютинин (НА, hemagglutinin) является основным антигеном вируса гриппа; он индуцирует образование вирус нейтрализующих антител при иммунизации. Изменчивость НА отвечает за антигенную изменчивость вируса гриппа. Хотя белок НА сильно варьирующ, его вторая субъединица (НА2), образующая домен стебля, относительно консервативна [Krystal *et al.*, 1982], особенно в пределах конкретной филогенетической группы белков НА (первая группа - подтипы Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13 и Н16, вторая группа - подтипы Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15), НА2 может быть использован в качестве антигена для создания вакцины с широким спектром защиты. Показано, что рекомбинантные белки на основе НА2 индуцируют гуморальные и Т-клеточные иммунные реакции и обеспечивают защиту от инфекции [Wang *et al.*, 2010; Ekiert *et al.*, 2011]. Как отмечалось в предыдущей главе, M2e, внеклеточный домен трансмембранного белка M2 вируса гриппа А, является одним из наиболее перспективных кандидатов на разработку “универсальной” вакцины. Комбинация M2e и НА2 в одном вакцинном белке является перспективным подходом для разработки вакцин против гриппа с широким спектром защиты [Ameghi *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2017; Stepanova *et al.*, 2018].

*Гибридный белок, содержащий флагеллин, фрагмент гемагглютинина и M2e пептиды вируса гриппа.*

Гибридный белок Flg4M2eNA2-1 содержал две копии M2e пептида вируса гриппа человека (консенсусная последовательность, M2eh), две копии M2e штамма A/H1N1pdm09, вызвавшего пандемию 2009г. (M2es), присоединенные к С-концу флагеллина *S. typhimurium*, а также консенсусную последовательность консервативного региона второй субъединицы гемагглютинина вируса гриппа А (альфа спираль, с 76 по 130 аа), которая



была помещена между флагеллином и 4xM2e. Отдельные копии M2e разделены между собой линкерами GGGSG для облегчения фолдинга белков. Для очистки белка с помощью металл-аффинной хроматографии последовательность 6 гистидинового тага была присоединена на N-конец гибридного белка (рис. 4.4.1). Гибридный белок состоит из 686 аа, расчетный мол. масса 72,6 kDa.

#### Создание фитовирусных векторов для экспрессии в растениях гибридного белка Flg4M2eHA2-1.

Для экспрессии гибридного белка использовали вектор pEff. Последовательность гена, кодирующего гибридный белок Flg4M2eHA2-1, была клонирована в pEff с использованием сайтов *AscI* / *XmaI* вместо гена *gfp* (рис. 4.4.1).

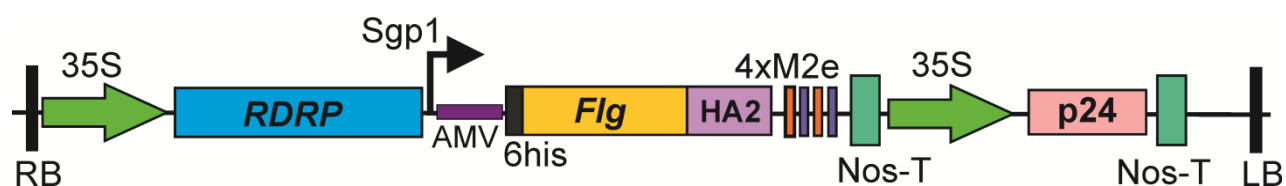


Рисунок 4.4.1. Структура вектора pEff\_Flg4M2eHA2-1.

6his, последовательность 6 остатков гистидина; Flg, флагеллин *S. typhimurium*; HA2, фрагмент гемагглютинаина (76 – 130 аа); 4M2e, последовательность четырех тандемных копий пептида M2e вируса гриппа А (M2eh-M2es-M2eh-M2es).

#### Экспрессия гибридного белка Flg4M2eHA2-1 в растениях *Nicotiana benthamiana*.

Для экспрессии гибридного белка Flg4M2eHA2-1 в растениях *N. benthamiana* вектор pEff\_Flg4M2eHA2-1 переносили в клетки агробактерий *A. tumefaciens* (GV3101) с помощью электропорации. Суспензией агробактерий инокулировали листья растений *N. benthamiana*.

Препараты суммарных растительных белков выделяли через 2, 4, 6 и 8 суток после агроинфильтрации и анализировали с помощью вестерн

блоттинга (рис. 4.4.2). Максимальный уровень экспрессии наблюдался на 4 день после заражения. Анализ суммарных белковых препаратов и растворимой фракции белков показал, что белок практически полностью нерастворим и; следовательно, очистку белкового препарата следует проводить в денатурирующих условиях.

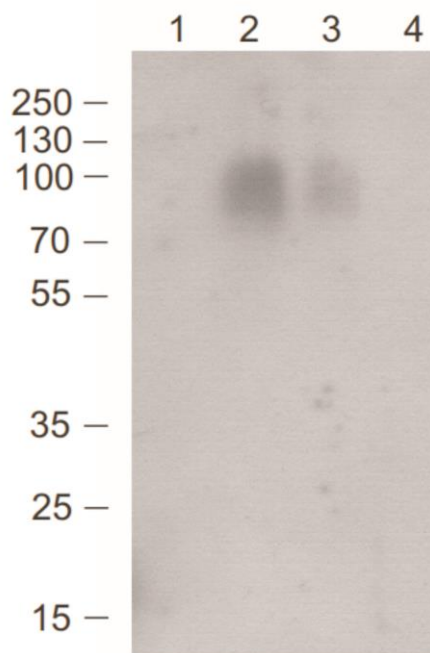


Рисунок 4.4.2. Вестерн блоттинг белков, выделенных из растений *N. benthamiana* через 2 (дорожка 1), 4 (дорожка 2), 6 (дорожка 3) и 8 (дорожка 4) дней после агроинfiltrации вектором pEff\_Flg4M2eHA2-1. Положения и размеры маркеров молекулярной массы (kDa) показаны слева.

#### *Препаративная экспрессия и очистка рекомбинантного белка Flg4M2eHA2-1.*

Для масштабного получения белка Flg4M2eHA2-1, препарат белков из зон агроинfiltrации выделяли через 4 суток после заражения. Рекомбинантные белки выделяли из 90 граммов листьев с помощью металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. После очистки полученные препараты диализовали против PBS. Дополнительно препарат белков ультрацентрифугировали при 100 000 g для удаления агрегатов RuBisCO.

Белковые препараты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга. Данные, представленные на рис. 4.4.3 свидетельствуют о том, что белок Flg4M2eHA2-1 эффективно экспрессируется в *N. benthamiana* на уровне 300  $\mu\text{g/g}$  биомассы листа. После выделения и очистки финальный выход составил 60  $\mu\text{g/g}$  растительной биомассы. После очистки было наработано около 5 мг препарата с чистотой около 90%. Полученный препарат использовали в экспериментах на лабораторных животных.

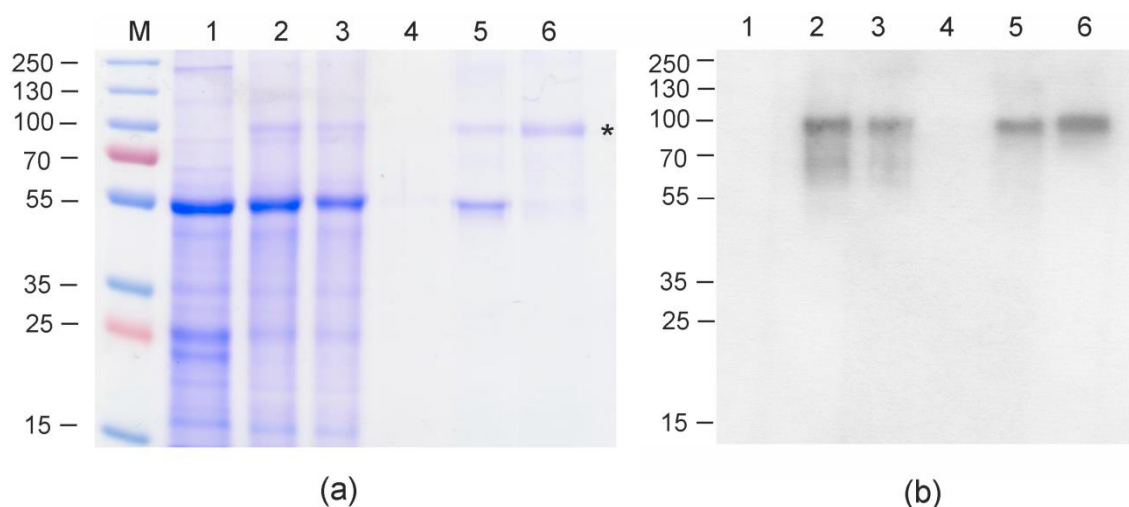


Рисунок 4.4.3. SDS-PAGE (a) и вестерн блоттинг (b) белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*.

M, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрованного листа; 2, препарат суммарного растительного белка, выделенного из листа, инфильтрованного pEff\_Flg4M2eHA2-1.

Очистка белка Flg4M2eHA2-1 на колонке Ni-NTA: 3, не связавшаяся фракция; полоса 4, промывка; полоса 5, элюат; полоса 6, очищенный белок Flg4M2eHA2-1 после ультрацентрифугирования и удаления RuBisCO (позиция показана звездочкой).

#### *Иммуногенность и протективное действие полученного в растениях белка Flg4M2eHA2-1.*

Для оценки иммуногенности и протективного действия белка Flg4M2eHA2-1 в качестве кандидатной вакцины против гриппа А были проведены эксперименты на лабораторных животных. BALB/c мыши (16–18 гр.) были иммунизированы препаратом Flg4M2eHA2-1 и «пустым»

флагеллином в качестве контроля. Мышей иммунизировали интраназально трижды с интервалом две недели в дозе 10  $\mu\text{g}$  белка без дополнительных адьювантов. Кровь и бронхо-альвеолярные лаваж (БАЛ) выделяли после третьей иммунизации. Сыворотки анализировали с помощью ИФА. Для идентификации M2e специфических антител IgG, IgG1, IgG2a, и IgA использовали синтетические пептиды G-37 и G-26, последовательности которых соответствуют M2eh и M2es, соответственно.

Было обнаружено, что иммунизация препаратом Flg4M2eHA2-1 индуцирует выработку высокого титра IgG в сыворотке у мышей, преимущественно субтипа IgG1 (рис. 4.4.4). Разница между титрами IgG1 и IgG2a статистически значима ( $p < 0,01$ ). Индуцированные антитела IgG и IgA почти одинаково эффективно связываются с пептидами G-37 и G-26.

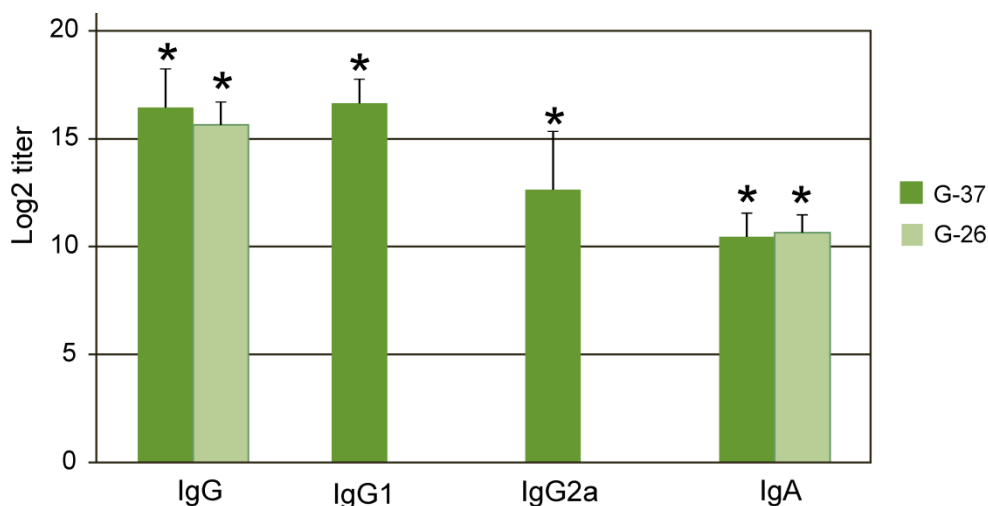


Рисунок 4.4.4. Титры антител IgG, IgG1, IgG2a и IgA к синтетическим M2e пептидам G-37 и G-26 в сыворотках мышей, иммунизированных Flg4M2eHA2-1, после третьей иммунизации. Результаты представлены в виде среднего титра  $\pm$  стандартное отклонение. Титры антител IgG1 и IgG2a к пептиду G-26 не измеряли. У мышей, иммунизированных PBS или Flg, титры антител были ниже 400 были. Значимые различия ( $p < 0,05$ ) от контрольных групп отмечены звездочкой (\*).

Для детекции IgA и IgG в секрете слизистых определяли титры M2e специфических антител в БАЛ. В БАЛ мышей, интраназально иммунизированных препаратом Flg4M2eHA2-1, наблюдались достоверно более высоких титры M2e-специфических IgG антител, чем в БАЛ мышей,

которым вводили контрольный флагеллин или PBS (рис. 4.4.5). В то же время статистически значимого уровня IgA антител к M2e по сравнению с контрольными группами не было обнаружено.

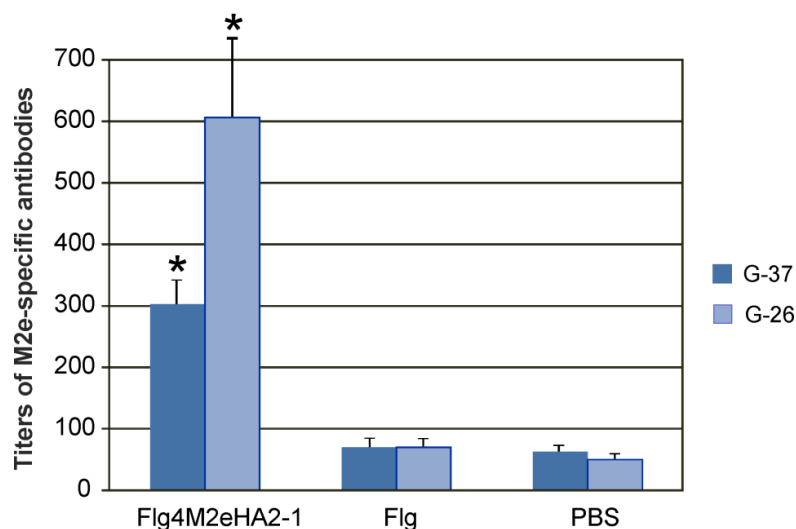


Рисунок 4.4.5. Титры антител IgG к синтетическому M2e пептиду G-37 и G-26 в БАЛ иммунизированных мышей после третьей иммунизации. Результаты представлены в виде среднего титра  $\pm$  стандартное отклонение для каждой группы. Значимые различия ( $p < 0,05$ ) от контрольных групп (Flg и PBS) отмечены звездочкой (\*). Различия между титрами специфичных к M2e антител, распознающих пептиды G-26 и G-37, не были статистически значимыми.

Титры IgG антител к HA2 определяли с помощью ИФА с использованием синтетических пептидов G-107 или смеси пептидов G-108 и G-109. Пептид G-107 представляет собой консенсусную последовательность с 93 до 122 а.к. HA2 вирусов гриппа А первой филогенетической группы, которая идентична фрагменту HA2-1 (76 – 130 а.к.) в составе белка Flg4M2eHA2-1. Пептиды G-108 и G-109 соответствуют участкам 99 – 130 а.к. и 76 – 106 а.к. HA2 вирусов гриппа А второй филогенетической группы.

Мы обнаружили, что иммунизация мышей препаратом Flg4M2eHA2-1 индуцирует довольно низкие титры HA-специфических IgG (рис. 4.4.5). Индуцированные антитела более эффективно связывались со смесью пептидов G-108 и G109, причем различия в титрах антител по сравнению с контрольными группами (Flg и PBS) были значимыми ( $p < 0,05$ ).

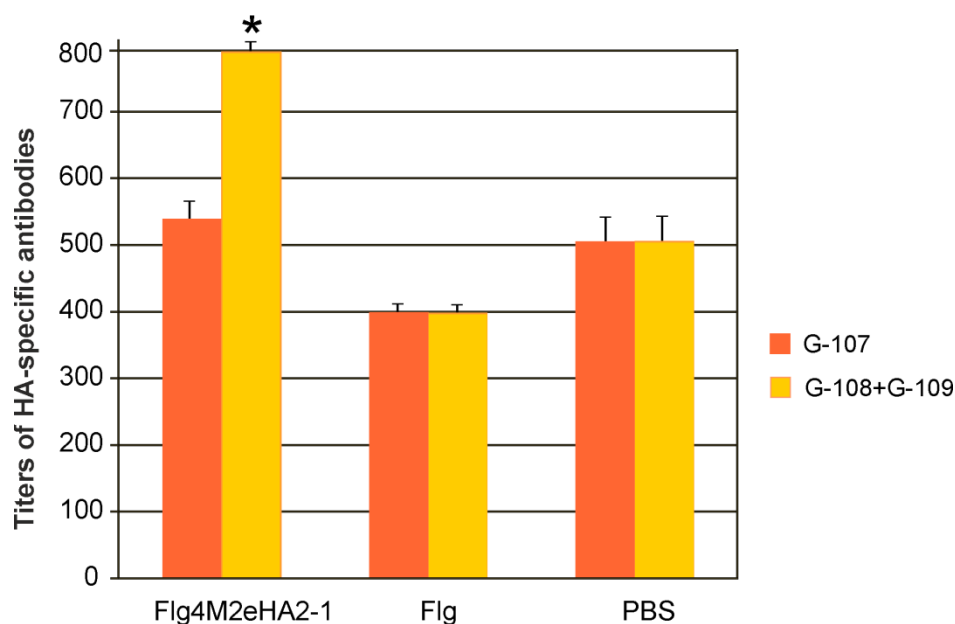


Рисунок 4.4.5. Титры антител IgG к синтетическим HA2 пептидам G-107 и смеси пептидов G-108 и G-109 в сыворотках иммунизированных мышей после третьей иммунизации. Результаты представлены в виде среднего титра  $\pm$  стандартное отклонение для каждой группы. Значимые различия ( $p < 0,05$ ) от контрольных групп отмечены звездочкой (\*). Различия между титрами специфичных к M2e антител, распознающих G-107 и смесь G-108/G109, не были статистически значимыми.

Для оценки протективного действия белка Flg4M2eHA2-1 иммунизированных мышей заражали адаптированным к мышам штаммом вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Как показано на рисунке 4.4.6, все мыши, иммунизированные Flg4M2eHA2-1, пережили заражение дозой  $2 \times LD_{50}$ , в то время как выживаемость среди контрольных групп была значительно ниже. Во втором эксперименте 90% мышей, иммунизированных Flg4M2eHA2-1, пережили заражение дозой  $5 \times LD_{50}$ , в то время как выживаемость среди контрольных мышей составила 30%.

Защитный эффект белка Flg4M2eHA2-1 подтверждает и снижение титров вируса в легких иммунизированных мышей по сравнению с контрольными мышами после заражения штаммом A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе  $5 \times LD_{50}$ . Титр вируса в легких зараженных иммунизированных мышей составлял  $3,2 \log_{10} TCID_{50}$  а в контрольной группе (PBS) -  $4,3 \log_{10} TCID_{50}$ , отличие было статистически значимым ( $p < 0,05$ ).

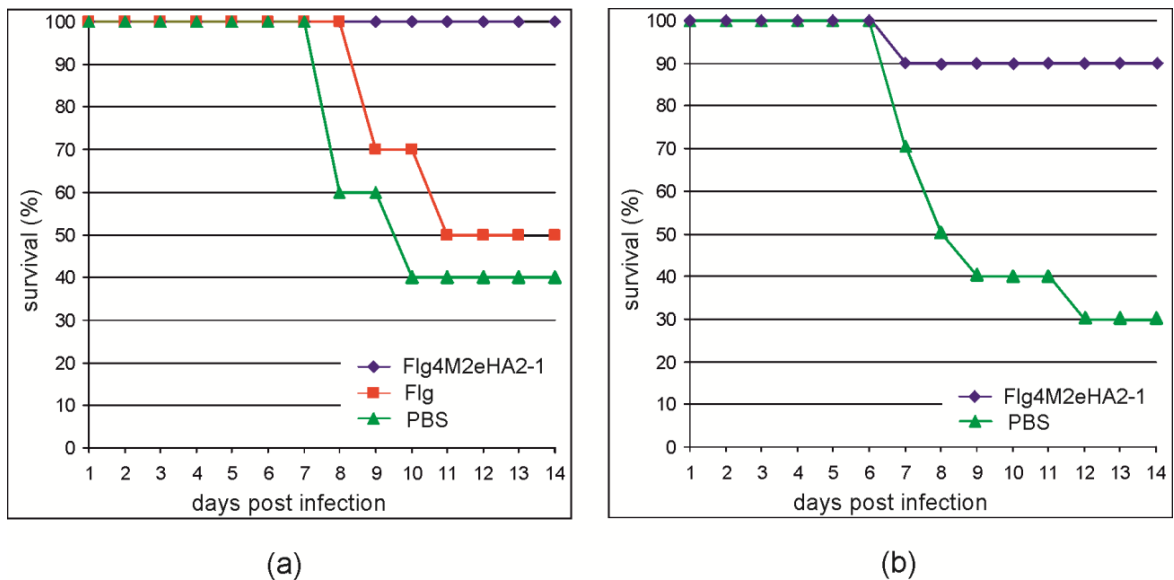


Рисунок 4.4.6. Протективное действие белка Flg4M2eHA2-1. Мышей заражали вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 2 x LD<sub>50</sub> (A) или 5 x LD<sub>50</sub> (B). Показана динамика гибели мышей в течение 14 дней после заражения.

### Заключение

Таким образом, мы экспрессировали гибридный белок, содержащий флагеллин с присоединенным фрагментом гемагглютинина и четырьмя копиями M2e пептида вируса гриппа А, в *N. benthamiana*. Использование вектора pEff позволило достичь уровня экспрессии до 300 µg/g листа. Интраназальная иммунизация очищенным рекомбинантным белком индуцировала у мышей высокие уровни M2e-специфических IgG антител при слабом иммунном ответе в отношении HA2, но при этом обеспечивала защиту против заражения вирусом гриппа. Этот белок, наряду с описанным в предыдущем разделе Flg-4M, может быть использован в качестве основы кандидатной «растительной» вакцины от гриппа А, которую можно вводить интраназально.

#### **4.5. Экспрессия в растениях капсидного белка вируса гепатита E и его применение в качестве носителя M2e пептида вируса гриппа A и рецептор-связывающего домена белка S коронавируса SARS-CoV-2.**

Инфекция, вызванная вирусом гепатита E (HEV, hepatitis E virus) является частой причиной острого гепатита. Общая летальность составляет около 1% и достигает 30% среди беременных женщин в третьем триместре [Wu *et al.*, 2020]. Разработка вакцин и диагностикумов для определения вируса гепатита E является актуальной задачей. В настоящее время в основе разработки рекомбинантных вакцин от гепатита E лежит использование капсидного белка (ORF2), способного собираться в наноразмерные частицы, по структуре сходные с HEV. Этот белок также является подходящим антигеном-кандидатом для серологического диагноза HEV.

Капсидный белок вируса гепатита E может быть использован не только в качестве основы вакцины от гепатита E и диагностикумов данного заболевания, но и как носитель чужеродных антигенов, подобно ядерному антигену вируса гепатита B. В данной работе капсидный белок HEV ORF2 был использован как в качестве основы для разработки вакцин против гепатита E и диагностикумов, так и в качестве носителя M2e пептида вируса гриппа A и рецептор-связывающего домена белка S коронавируса SARS-CoV-2.

##### *Дизайн и синтез генов, кодирующих капсидный белок вируса гепатита E.*

Полноразмерный капсидный белок HEV ORF2 состоит из 660 аминокислот и имеет молекулярную массу 72 кДа. Белок включает сигнал локализации в эндоплазматическом ретикулуме на N-конце, за которым следует богатая аргинином последовательность, участвующая в инкапсуляции вирусной РНК [Meng *et al.*, 2008]. Капсидный белок включает три домена: S (оболочка; аминокислоты 112–319), M (средняя часть; аминокислоты 320–455) и P (внешняя часть; аминокислоты 456–606) [Yamashita *et al.*, 2009]. S-домен собирается в стабильную икосаэдрическую



частицу, в то время как Р-домен выступает в виде поверхностного шипа, который участвует во взаимодействиях с клетками хозяина и содержит нейтрализующие эпитопы [Guu *et al.*, 2009].

Оптимальный вариант капсидного белка был выбран на основании данных по экспрессии HEV ORF2 в растениях, полученных нашими коллегами [Zahmanova *et al.*, 2020]. Было проанализировано 6 вариантов последовательностей, включающих аминокислоты 1-660, 1-610, 110-660, 33-660, 33-610 и 110-660. Наилучший результат (экспрессия в растениях и образование вирусоподобных частиц) был получен для варианта 110 – 610 aa (далее - HEV110-610), поэтому он и был использован в работе.

#### *Создание фитовирусных векторов для экспрессии капсидного белка HEV110-610 и гибридного капсидного белка – носителя M2e пептида.*

На первом этапе мы анализировали эффективность экспрессии капсидного белка HEV в растениях *N. benthamiana* с использованием двух векторов: pEAQ и pEff. Рекомбинантные векторы pEAQ-HEV и pEAQ-M2-HEV110-610 (M2e включен в положение Gly556 капсида HEV) были предоставлены д-ром Gergana Zahmanova (Университет Пловдива, Болгария).

Для создания экспрессионного вектора на основе pEff последовательность HEV110-610 получали с помощью ПЦР с использованием пары праймеров HEV110\_Asc-F / HEV\_Sma-R, в качестве матрицы использовали вектор pEAQ-HEV. Полученный ПЦР фрагмент был клонирован в векторе pEff по сайтам рестрикции AscI / XmaI. В результате был получен рекомбинантный вектор pEff-HEV110-610.

Для создания вектора pEff, предназначенного для экспрессии HEV110-610 с M2e пептидом, последовательность M2 HEV110-610 получали аналогичным образом, но в качестве матрицы для ПЦР использовали вектор pEAQ-M2 HEV110-610. В результате был получен вектор pEff-M2-HEV110-610. Схема полученных векторов представлена на рис. 4.5.1.

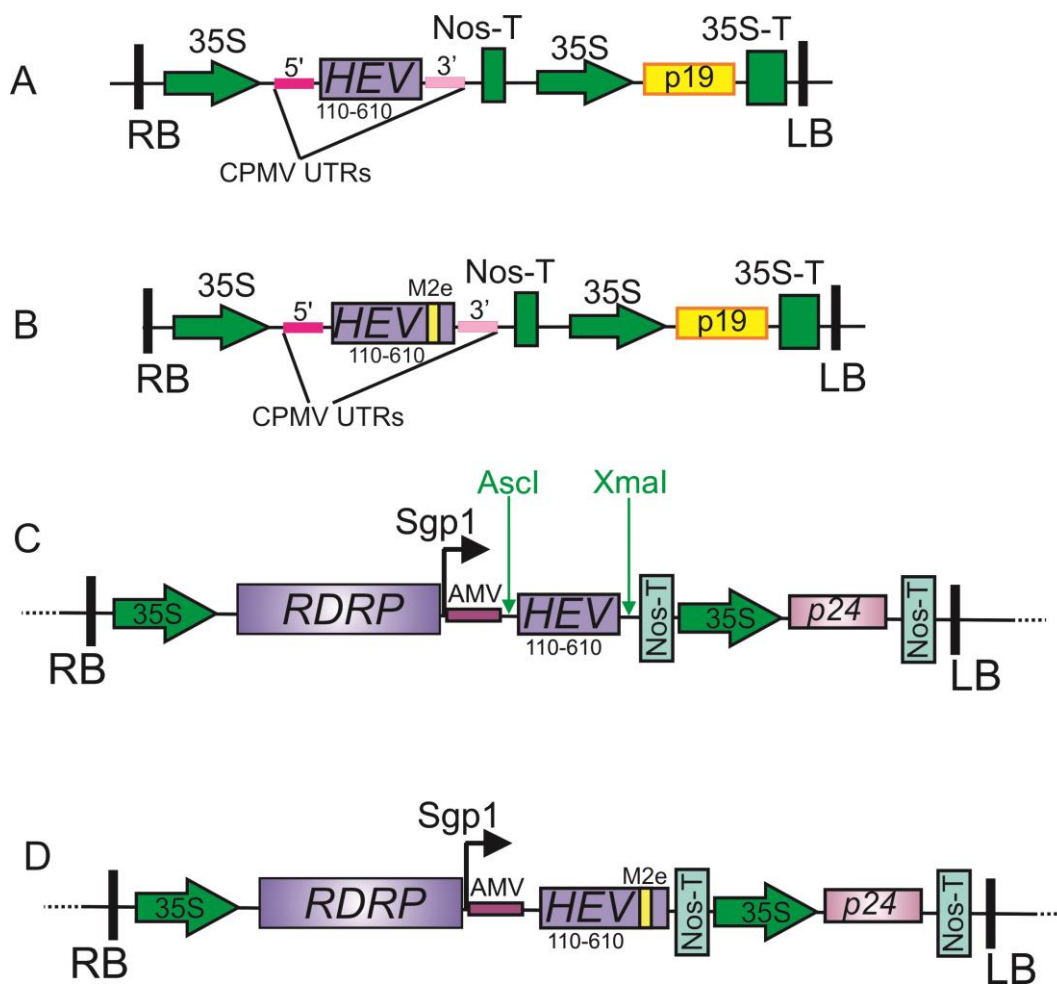


Рисунок 4.5.1. Структура экспрессионных векторов pEAQ-HEV110-610 (A), pEAQ-M2 HEV110-610 (B), pEff-HEV110-610 (C), и pEff-M2 HEV110-610 (D).

Белок HEV110-610 имеет длину 502 а.к. и расчетный мол. вес 54 кДа, а гибридный белок M2-HEV110-610 – длину 528 а.к. и мол. вес 56.9 кДа.

На первом этапе сравнивали эффективность синтеза белков M2 HEV110-610 и HEV110-610 в двух системах экспрессии. Для этого соответствующие экспрессионные векторы вводили в клетки растений *N. benthamiana* с помощью агроинfiltrации. Зоны заражения для четырех векторов находились в пределах одного листа. Заражали не менее трех независимых листов. Препараты суммарных растительных белков выделяли через 4 суток после заражения и анализировали с помощью SDS-PAGE (рис. 4.5.2). Суммируя результаты экспрессии по нескольким листьям, можно сделать вывод, что pEff обеспечивает более высокий уровень экспрессии для

исследуемых белков по сравнению с рЕАQ. В последующих экспериментах по экспрессии гибридных белков использовали вектор рЕff.

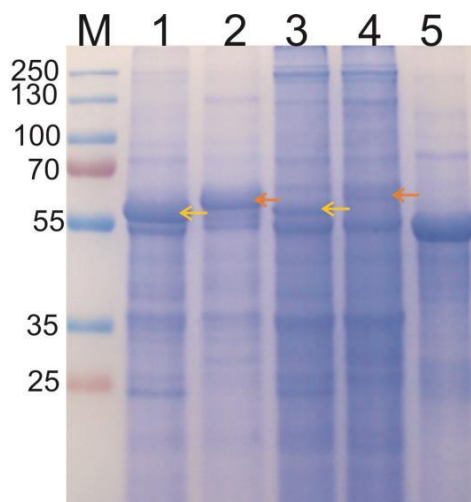


Рисунок 4.5.2. Сравнение эффективности экспрессии рекомбинантных капсидных белков HEV с помощью векторов рЕАQ и рЕff.

Приведен SDS-PAGE суммарных белковых препаратов, выделенных из листьев растений *N. benthamiana* инфильтрованных векторами рЕff\_HEV110-610 (1), рЕff\_M2 HEV110-610 (2), рЕАQ\_HEV110-610 (3), рЕАQ\_M2 HEV110-610 (4). М, маркер молекулярного веса (кДа); на дорожке 5 показан препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрованного листа.

#### *Оптимизация экспрессии в растениях капсидного белка HEV110-610, его выделение и очистка.*

Для определения оптимального времени культивирования растений после инфильтрации агробактериями с вектором рЕff\_HEV110-610 препараты суммарных растворимых растительных белков выделяли ежедневно, в интервале с 2 по 6 суток после агроинфильтрации и анализировали с помощью SDS-PAGE. Максимальный уровень экспрессии наблюдали через 3 – 4 суток после заражения (Рисунок 4.5.3).

Препараты белков из зон агроинфильтрации выделяли через 4 суток после заражения (рис. 4.5.4). Белок оказался в растворимой фракции. Эффективность экспрессии составила ~ 10% от суммарного растворимого белка, что соответствует ~ 300  $\mu$ g с 1 g растительной биомассы.

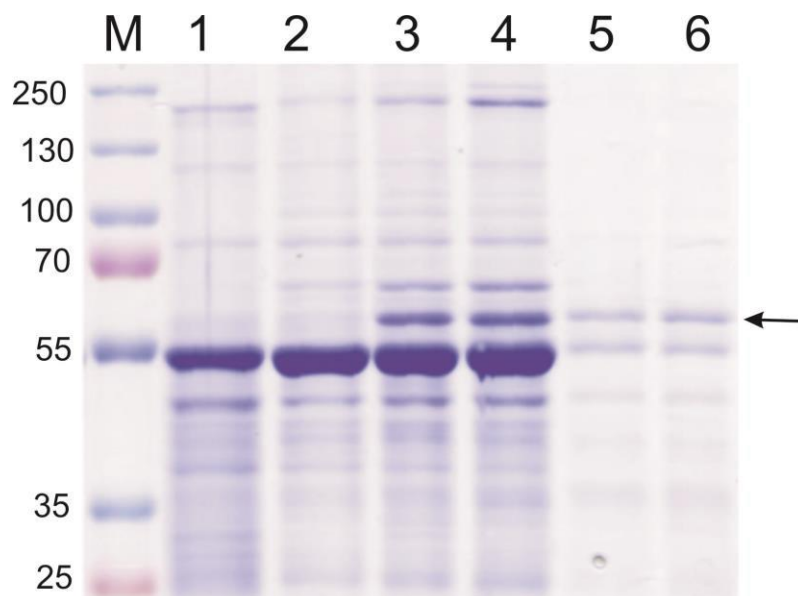


Рисунок 4.5.3. SDS-PAGE белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного растворимого белка, выделенного из неинфильтрированного листа; Препараты суммарного растворимого растительного белка, выделенного из листа, инфицированного рEff\_HEV110-610 через 2, 3, 4, 5, 6 суток после заражения. Номера дорожек соответствуют суткам после инфильтрации.

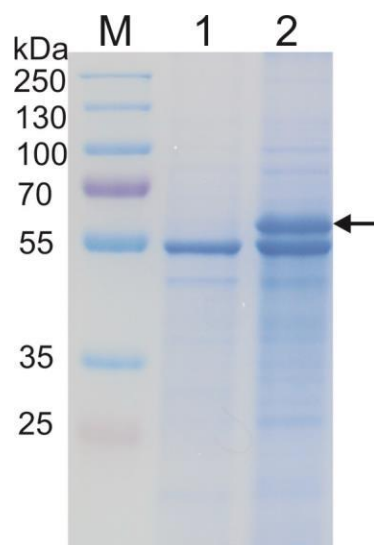


Рисунок 4.5.4. SDS-PAGE белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного растворимого белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного растворимого растительного белка, выделенного из листа, инфицированного рEff\_HEV110-610.

Для возможности выделения из растений-продуцентов белка HEV110-610 с помощью металл-аффинной хроматографии на С-конец соответствующего гена вводили последовательность, кодирующую гексагистиридиновый таг. Для этого получали ПЦР фрагмент HEV110-610 с помощью праймеров HEV110\_Asc-F и HEV-his\_R (кодирует his-таг). Полученный ПЦР фрагмент клонировали в векторе pEff, в результате был получен экспрессионный вектор pEff-HEV110-610\_his.

Вектор вводили в клетки *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации, препараты белков выделяли через 4 суток. Очистку белка HEV110-610\_his проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в нативных условиях (рис. 4.5.5).

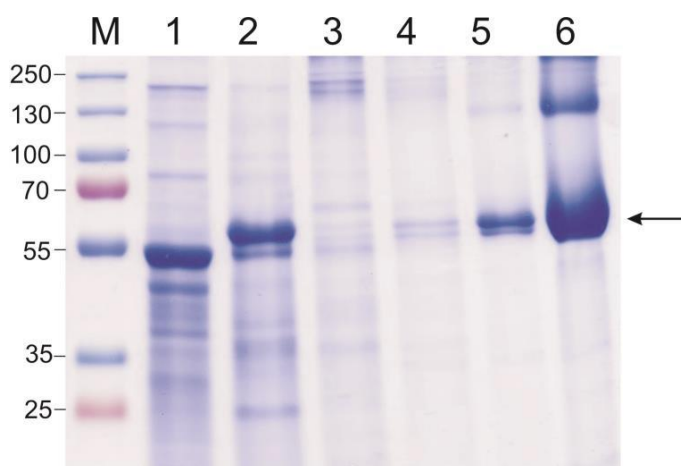


Рисунок 4.5.5. Экспрессия и очистка белка HEV110-610\_his.

SDS-PAGE: М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного растворимого белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного растворимого растительного белка, выделенного из листа, инфильтрированного pEff\_ HEV110-610\_his; 3, не связавшаяся с колонкой фракция; 4, 1-ая промывка (10 mM имидазола); 5, 2-ая промывка (20 mM имидазола); 6, элюат – очищенный белок HEV110-610\_his.

После очистки полученные препараты диализовали против PBS и анализировали с помощью SDS-PAGE (рис. 4.5.6) и вестерн блоттинга

(рис. 4.5.7). В качестве первичных антител использовали мышинные антитела против HEV.

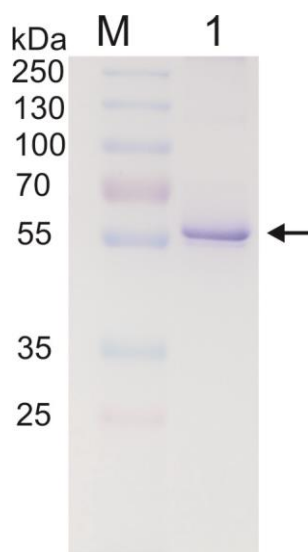


Рисунок 4.5.6. SDS-PAGE очищенного белка HEV110-610\_his. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат очищенного белка HEV110-610\_his.

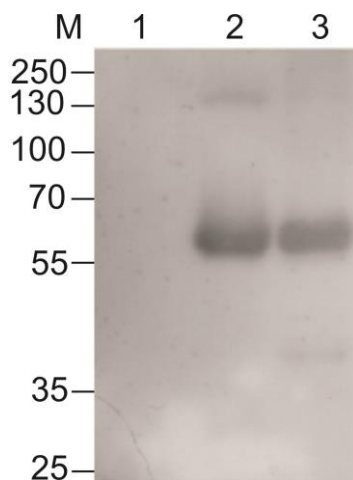


Рисунок 4.5.7. Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного растворимого растительного белка, выделенного из листа, инфильтрированного рEff\_HEV110-610\_his; 3, препарат очищенного белка HEV110-610\_his.

В результате препарат HEV110-610\_his был наработан в растениях в количестве около 10 мг. Конечный выход препарата HEV110-610\_his составил 150 – 200  $\mu\text{g}$  с 1 г растительной биомассы, чистота - более 95%.

*Структурная характеристика вирусоподобных частиц, образуемых капсидным белком HEV110-610.*

Формирование вирусоподобных частиц HEV110-610\_his в растениях анализировали методом динамического светорассеяния, а также атомно-силовой и электронной микроскопии. Исследовали очищенный препарат белка HEV110-610\_his.

Образованные белком высокомолекулярные структуры анализировали с помощью Malvern Zetasizer Nano S90. На рисунке 4.5.81 представлены результаты исследования. Были обнаружены частицы размером 11 – 17 нм, а также агрегаты большего размера.

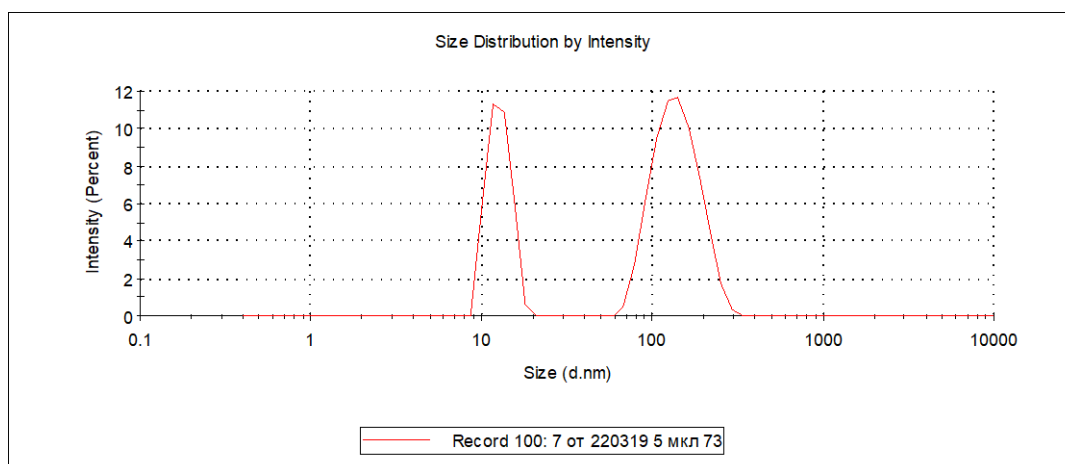


Рисунок 4.5.8. Распределение образованных в растениях частиц HEV110-610\_his по размерам.

Структуру частиц также исследовали методом атомно-силовой микроскопии на приборе INTEGRA (NT-MDT). Наблюдали образование частиц размером 11 – 16 нм (рисунок 4.5.9).



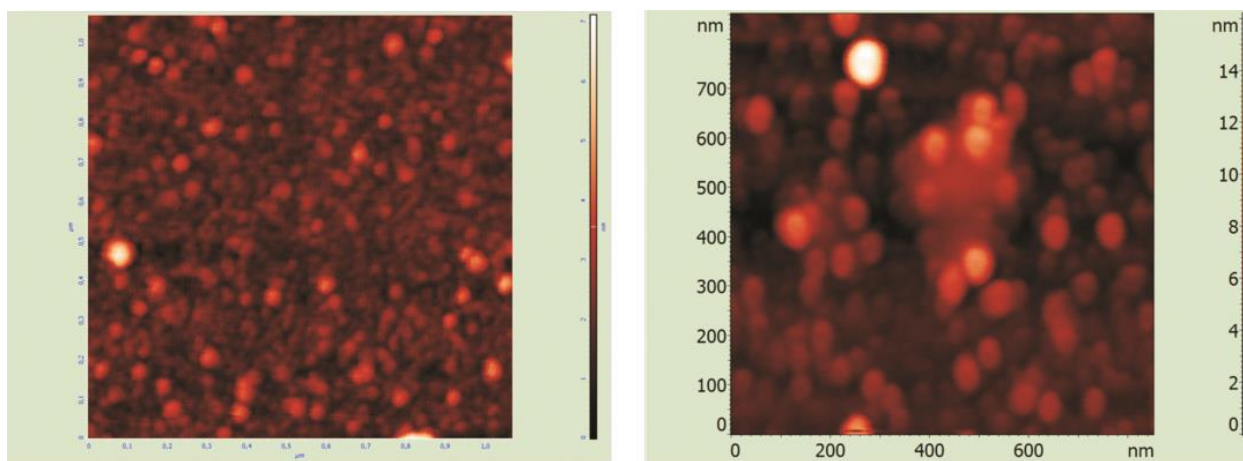


Рисунок 4.5.9. Атомно-силовая микроскопия частиц, образованных HEV110-610\_his в растениях.

Вирусоподобные частицы также исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEOL LEM 1011. Результаты представлены на рисунке 4.5.10. Были обнаружены частицы размером 12 – 26 нм. Частицы имеют сферическую форму и полые внутри.

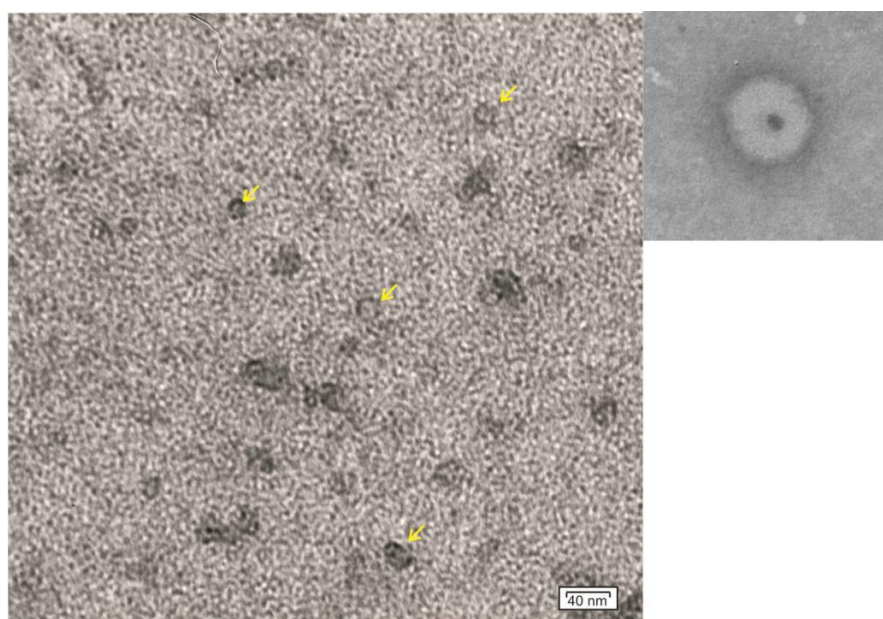


Рисунок 4.5.10. Электронная микроскопия препарата HEV110-610\_his частиц.

Таким образом, образование белком HEV110-610\_his вирусоподобных частиц в растениях *N. benthamiana* было подтверждено с помощью трех методов. Размер частиц оценивался в пределах 11 – 17 нм методами



динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии, а по данным электронной микроскопии он составлял 12 – 26 нм. Эти результаты согласуются с данными, полученными нашими коллегами для белка HEV110-610, экспрессированного в растениях с использованием вектора pEAQ (Zahmanova 2020). Размер частиц в этом случае по данным электронной микроскопии составлял 19-31 нм.

#### *Иммуногенность полученного в растениях белка HEV110-610\_his*

Для оценки иммуногенности вирусоподобных частиц HEV110-610\_his в качестве кандидаткой вакцины против гепатита E были проведены эксперименты на лабораторных животных.

Balb/c мыши (16–18 гр) были иммунизированы препаратом HEV110-610\_his и PBS в качестве контроля. Мышей иммунизировали внутримышечно трижды с интервалом две недели в дозе 50 µg белка с Деринатом в качестве адьюванта. Образцы крови выделяли через две недели после третьей иммунизации. Сыворотки анализировали с помощью ИФА (таблица 4.5.1).

Таблица 4.5.2. Титры IgG антител к HEV в сыворотке мышей, иммунизированных препаратом HEV110-610\_his через две недели после третьей иммунизации

Группа/препарат	№ мыши	титр антител
HEV110-610_his	1	102400
	2	204800
	3	204800
	4	25600
	5	204800
среднее геометрическое		117626 ± 6311
PBS	1	800
	2	800
	3	800
	4	400
среднее геометрическое		673 ± 21

Таким образом, белок HEV110-610\_his синтезируется в растениях *N. benthamiana* на уровне ~ 300 µg с 1 g биомассы листа, является растворимым,

выделяется с помощью металл-аффинной хроматографии с конечным выходом 150 – 200 µg/g. Белок формирует вирусоподобные частицы размером ~ 15 – 20 нм. Иммунизация мышей препаратом HEV110-610\_his приводит к выработке специфических IgG антител на высоком уровне. Данный препарат может быть использован в качестве кандидатной вакцины от вируса гепатита E, а также в качестве основы для создания диагностикума для данного заболевания.

*б. Дизайн и синтез генов, кодирующих гибридные капсидные белки вируса гепатита E, содержащие M2e пептид вируса гриппа A.*

Капсидный белок вируса гепатита E использован нами также в качестве носителя M2e пептида вируса гриппа.). Использовали «консенсусный» человеческий M2e пептид вируса гриппа A, который присоединяли к укороченному варианту белка оболочки вируса гепатита E (HEV110-610\_.

Было исследовано два варианта вставки M2e пептида. В первом варианте последовательность M2e была включена в капсидный белок вируса гепатита E после Gly556. Во втором варианте последовательность M2e, фланкированная с двух сторон гибкими линкерами GGGSG для лучшего фолдинга белков, была включена после Tyr485 (рис. 4.5.11). Для возможности выделения рекомбинантных белков с помощью металл-аффинной хроматографии на 3'-конец соответствующих генов вводили последовательность, кодирующую 6-гистидиновый таг.

Последовательности генов гибридных белков клонировали в экспрессионном векторе pEff.

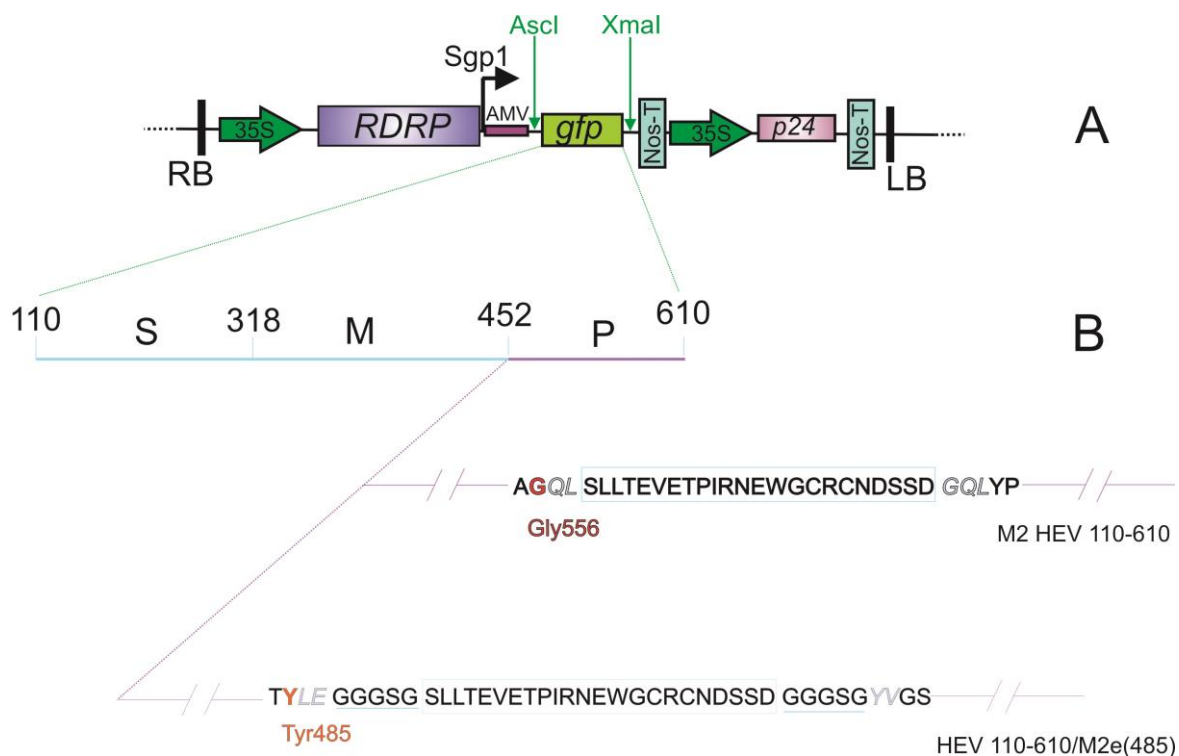


Рисунок 4.5.11. Структура экспрессионного вектора (А) и химерных белков (В). М2е пептид был включен в положение Gly556 в векторе рEff-M2 HEV110–610 и в положение Tyr485 в векторе рEff\_HEV110-610/M2e(485).

*Экспрессия гибридных капсидных белков вируса гепатита E, содержащих M2e пептид вируса гриппа А, в N. benthamiana.*

Для экспрессии гибридных белков в растениях *N. benthamiana* соответствующие векторы переносили в *A. tumefaciens* (GV3101). Суспензией агробактерий инокулировали листья растений *N. benthamiana*. На одном листе находились одновременно три зоны инфильтрации, соответствующие векторам рEff-HEV110–610 (контроль без M2e), рEff-M2 HEV110–610 и рEff\_HEV110-610/M2e(485). Через 4 суток после заражения из зон агроинфильтрации выделяли препараты растворимых белков и анализировали их с помощью SDS-PAGE (рис. 4.5.12).

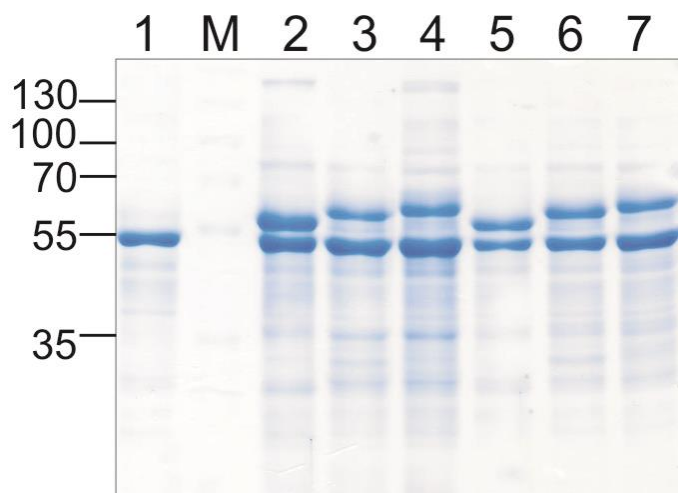


Рисунок 4.5.12. SDS-PAGE белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana* (проанализировано два листа). М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат растворимого белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, 5, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфицированного рEff\_HEV110-610; 3, 6, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфицированного рEff-M2 HEV110-610; 4, 7, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфицированного рEff\_HEV 110-610/M2e(485); Дорожки 2 – 4 соответствуют листу 1, дорожки 5 – 7 соответствуют листу 2.

По результатам SDS-PAGE можно сделать вывод, что все три белка синтезируются в растениях *N. benthamiana*. Суммируя результаты по нескольким листьям, можно сделать вывод, что все три белка синтезируются на высоком уровне, до 10% от растворимого белка, т.е. до 300  $\mu\text{g}$  с 1 г растительной биомассы.

Для проверки растворимости белка M2 HEV110-610 и HEV 110-610/M2e(485) в растениях анализировали суммарную, растворимую и нерастворимую фракции белков с помощью вестерн блоттинга с антителами против M2e пептида (рис. 4.5.13). Было установлено, что оба белка присутствуют в основном в растворимой фракции.

Для препаративного выделения рекомбинантных белков из растительной ткани определяли оптимальное время выращивания растений после агроинфильтрации. Для этого выделяли препараты растворимых белков на 2, 3, 4 и 5 сутки после агроинфильтрации. При более длительном времени инкубации в зонах заражения наблюдался некроз. На рисунке 4.5.14

представлены результаты SDS-PAGE белковых препаратов. Максимальный уровень экспрессии наблюдался на 3 – 4 сутки после инфильтрации.

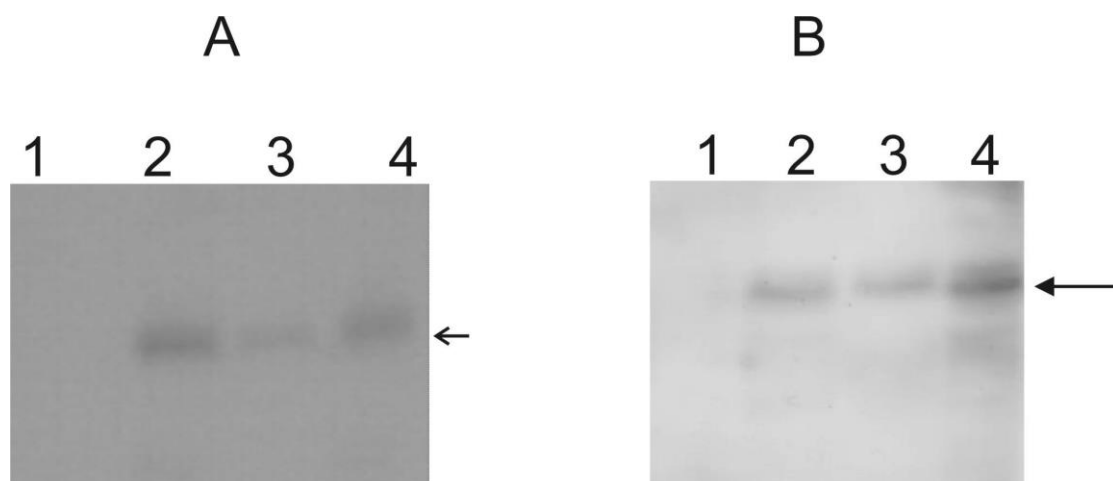


Рисунок 4.5.13. Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*, инфильтрованных rEff-M2 HEV110-610 (А) и rEff\_HEV 110-610/M2e(485) (В). 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрованного листа; 2, растворимая фракция; 3, нерастворимая фракция; 4, суммарный белок.

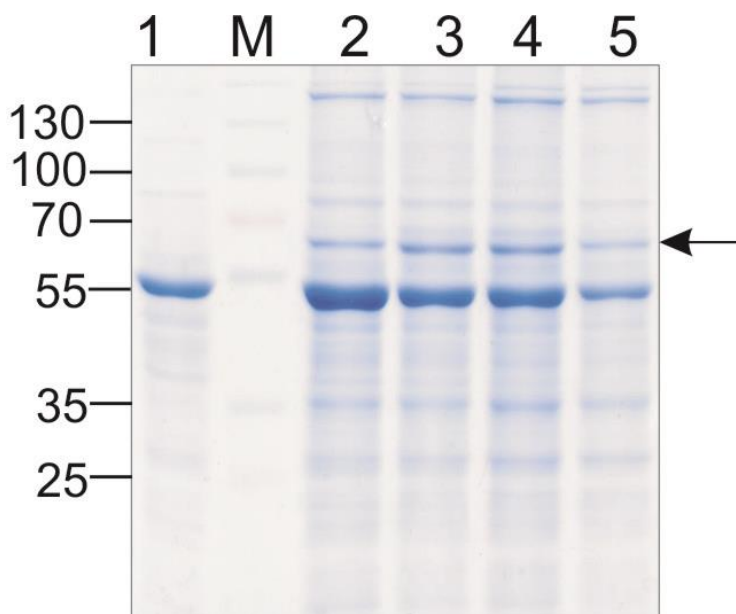


Рисунок 4.5.14. SDS-PAGE белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (kDa); 1, препарат растворимого белка, выделенного из неинфильтрованного листа; Препараты растворимого белка, выделенного из листа, инфильтрованного rEff\_HEV110-610//M2e(485) через 2, 3, 4, 5 суток после заражения. Номера дорожек соответствуют суткам после инфильтрации.

### *Препаративная экспрессия и выделение белков M2 HEV110-610 и HEV110-610/M2e(485) из растений-продуцентов*

Для масштабного получения белков M2 HEV110-610 и HEV110-610/M2e(485) препараты белков из зон агроинфильтрации выделяли через 4 суток после агроинфильтрации. Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в нативных условиях. На рисунке 4.5.15 проиллюстрирована очистка белка HEV110-610/M2e(485). Наряду с мономером после очистки наблюдались полосы более высокого молекулярного веса (дор. 6 на рис. 4.5.15)

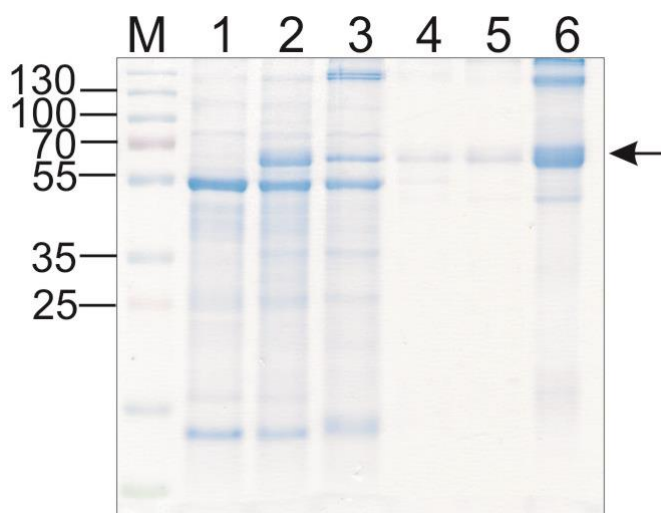


Рисунок 4.5.15. Очистка рекомбинантного белка HEV110-610/M2e(485). Приведены результаты SDS-PAGE. М, М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат растворимого белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфильтрированного rEff\_HEV110-610/M2e(485); 3, несвязавшаяся с сорбентом фракция; 4, 1-ая промывка (10 mM имидазол); 5, 2-ая промывка (20 mM имидазола); 6, элюат – очищенный белок HEV110-610/M2e(485).

Дополнительно анализ очищенных белков проводили с помощью вестерн блоттинга с антителами против HEV и M2e пептида (рис. 4.5.16). Поскольку белки более высокого молекулярного веса распознавались антителами так же, как и мономер, вероятно, они представляют собой не примеси, а агрегаты гибридного капсидного белка.

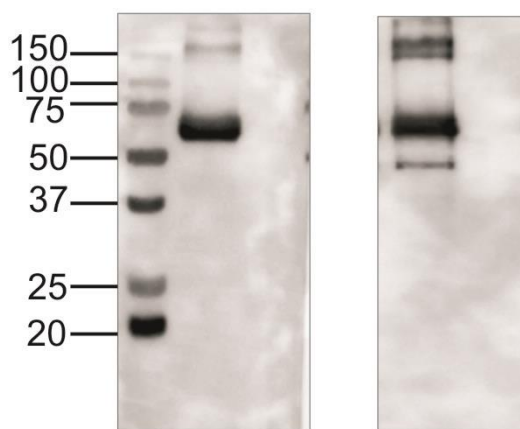


Рисунок 4.5.16. Вестерн блоттинг препаратов рекомбинантного белка HEV110-610/M2e(485), выделенных из растений *N. benthamiana*. (дорожка 1). Используются антитела к M2e (слева) и к HEV (справа).

Белок M2 HEV110-610 выделяли аналогичным образом. Отличие заключалось в том, что для предотвращения агрегации белка к суммарной белковой фракции добавляли 0,5% Triton X-100. Очищенный препарат анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга с антителами против M2e пептида (рис. 4.5.17).

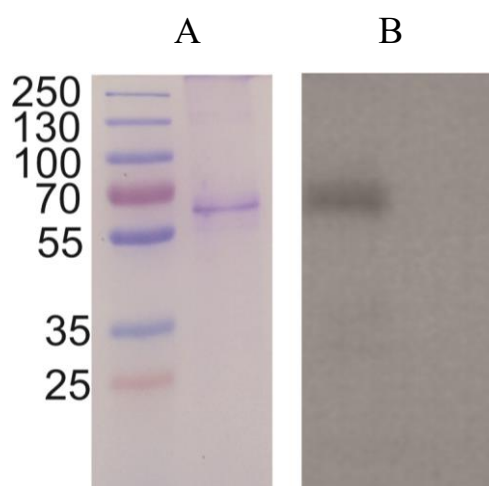


Рисунок 4.5.17. SDS-PAGE (A) и вестерн-блотт анализ (B) рекомбинантного белка M2 HEV110-610, выделенного из *N. benthamiana*.

В результате препараты белков M2 HEV110-610 и HEV110-610/M2e(485) были наработаны в миллиграммовых количествах для дальнейшего анализа.

*Структурная характеристика вирусоподобных частиц, образуемых белками M2 HEV110-610 и HEV110-610/M2e(485).*

Образование наночастиц белком M2 HEV110-610 анализировали методом динамического светорассеяния. Обнаружены частицы размером около 30 нм, а также агрегаты большего размера.

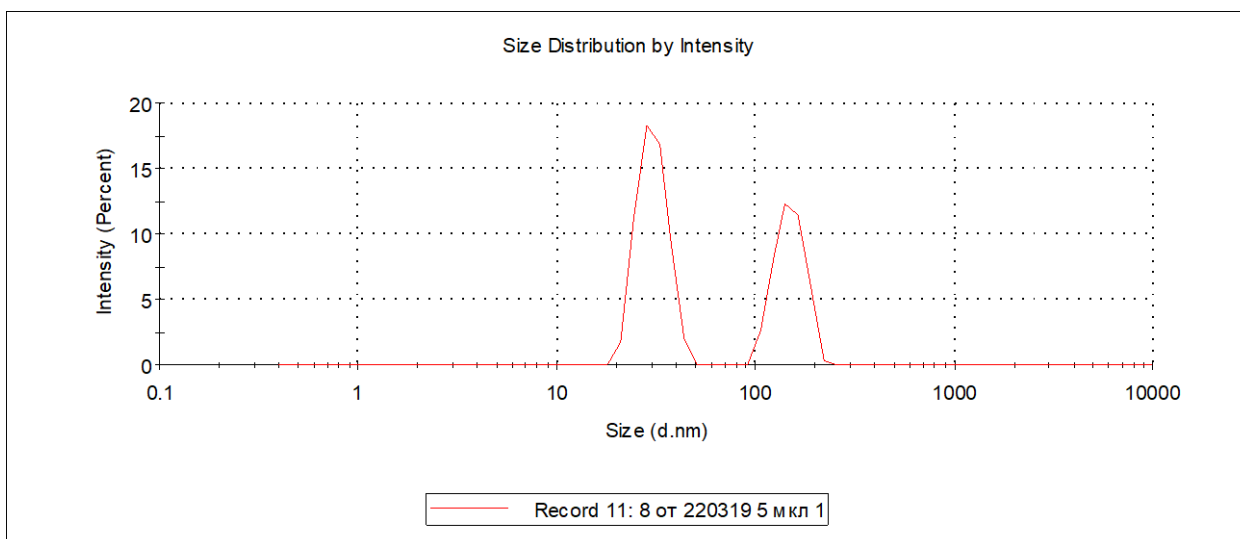


Рисунок 4.5.18. Распределение образованных в растениях частиц M2 HEV110-610 по размерам, полученное с помощью Malvern Zetasizer Nano S90. Размер частиц:  $31 \pm 5$  нм.

Структуру M2 HEV110-610 частиц также анализировали методами атомно-силовой микроскопии (рисунок 4.5.19) и просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 4.5.20). По данным атомно-силовой микроскопии частицы имеют размер 26 – 32 нм. С помощью электронной микроскопии размер частиц оценивается в  $39 \pm 9$  нм. Частицы M2 HEV110-610 имеют сферическую форму и являются полыми внутри.



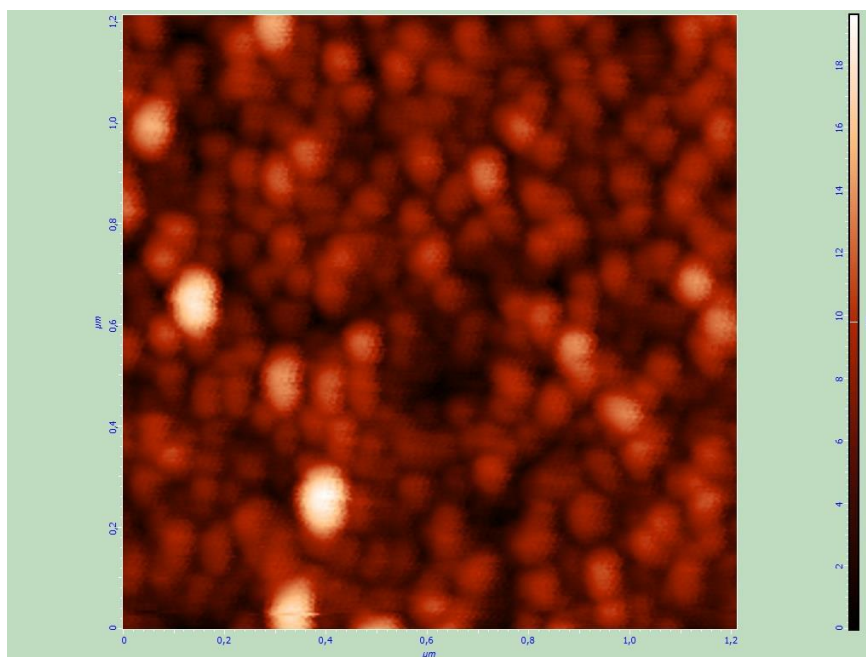


Рисунок 4.5.19. Атомно-силовая микроскопия частиц, образованных M2 HEV110-610. Размер частиц: 26 – 32 нм.

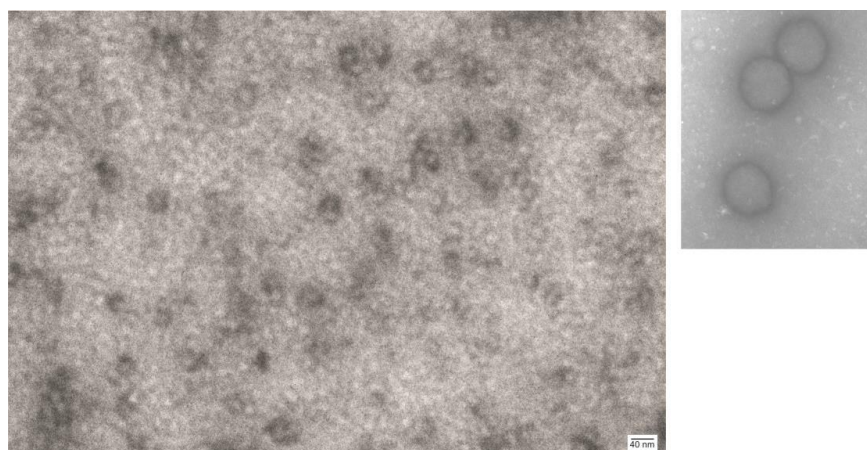


Рисунок 4.5.20. Электронная микроскопия частиц, образованных M2 HEV110-610. Препараты исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL LEM 1011. Размер частиц:  $39 \pm 9$  нм.

Структуру наночастиц, образованных гибридным капсидным белком HEV110-610/M2e(485) анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL LEM 1011 (рисунок 4.5.21). Были обнаружены частицы размером 40-50 нм.

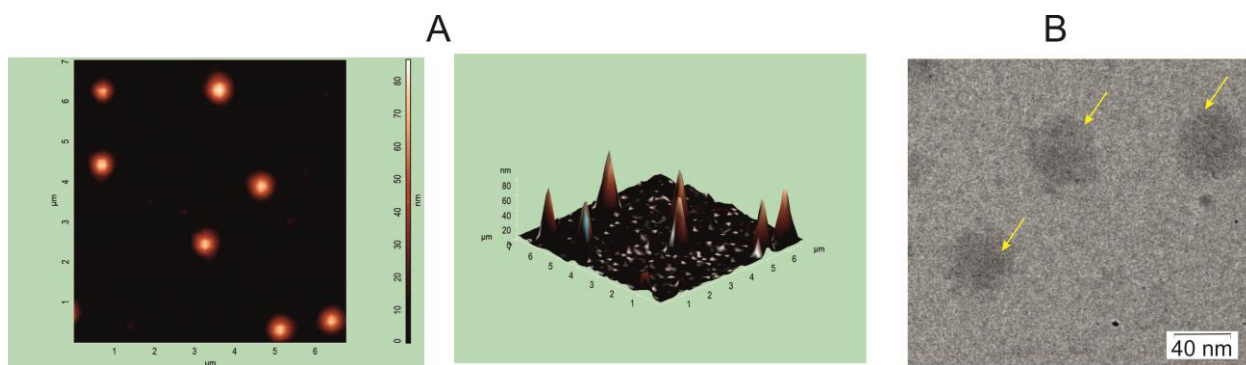


Рисунок 4.5.21. (А) Атомно-силовая и (В) электронная микроскопия частиц, образованных HEV110-610/M2e(485). Размер частиц:  $42 \pm 6$  нм.

*Иммуногенность полученных в растениях рекомбинантных белков M2 HEV110-610 и HEV110-610/M2e(485)*

Для оценки иммуногенности белков M2 HEV110-610 и HEV110-610/M2e(485) в качестве кандидаткой вакцины против гриппа А были проведены эксперименты на лабораторных животных.

Valb/c мыши (16–18 гр) были иммунизированы препаратами HEV110-610, M2 HEV110-610, HEV110-610/M2e(485) и PBS в качестве контроля. Мышей иммунизировали внутримышечно трижды с интервалом две недели в дозе 50  $\mu$ g белка с Деринатом в качестве адьюванта. Образцы крови выделяли через две недели после третьей иммунизации. Титры антител к HEV и M2e пептиду определяли с помощью ИФА. Было проведено два независимых эксперимента: в первом участвовали препараты HEV110-610, M2 HEV110-610 и PBS (таблица 4.5.2); во втором эксперименте – HEV110-610/M2e(485) и PBS (таблица 4.5.3).

Таблица 4.5.2. Эксперимент № 1. Титры IgG антител к M2e (синтетический пептид G-37) и HEV в сыворотке мышей, иммунизированных препаратами HEV110-610 и M2 HEV110-610 после второй и третьей иммунизации

№	Препарат/мышь		IgG		
			G37		HEV После 3-й иммунизации
			После 2-й иммунизации	После 3-й иммунизации	
1	M2 HEV110-610	1	400	400	102400
		2	400	400	204800
		3	400	800	204800
		4	400	400	204800
		5	400	400	102400
		<b>СГТ</b>	<b>400,0</b>	<b>459,5*</b>	<b>155 209,4**</b>
2	HEV110-610	1	400	400	102400
		2	400	400	204800
		3	400	400	204800
		4	200	400	25600
		5	200	400	204800
		<b>СГТ</b>	<b>303,1</b>	<b>400,0</b>	<b>117 626,7**</b>
3	PBS	1	400	200	800
		2	200	400	800
		3	200	400	800
		4	-	200	400
		5	-	200	-
		<b>СГТ</b>	<b>251,9</b>	<b>263,9</b>	<b>672,7</b>

\*—достоверное отличие от контрольной группы,  $p < 0.05$ , \*\*— достоверное отличие от контрольной группы,  $p < 0.01$ .

Таблица 4.5.3. Эксперимент № 2. Титры IgG антител к M2e (синтетически пептид G-37) и HEV в сыворотке мышей, иммунизированных препаратом HEV110-610/M2e(485) после второй и третьей иммунизации

№	Препарат/мышь		IgG		
			G37		HEV
			После 2-й иммунизации	После 3-й иммунизации	После 3-й иммунизации
1	HEV110-610/M2e(485)	1	800	3200	409600
		2	400	3200	409600
		3	400	3200	409600
		4	400	3200	409600
		5	1600	1600	204800
		<b>СГТ</b>	<b>606,29</b>	<b>2785,76**</b>	<b>356 577,51**</b>
3	PBS	1	800	1600	1600
		2	400	400	800
		3	-	400	1600
		4	-	800	400
		5	-	400	400
		<b>СГТ</b>	<b>565,69</b>	<b>606,29</b>	<b>800</b>

\*\*— достоверное отличие от контрольной группы,  $p < 0.01$ .

Полученные результаты показывают, что иммунизация белками HEV 110-610, M2 HEV 110–610 и HEV 110-610/M2e(485) вызывает образование высоких титров IgG антител, специфических к HEV. Иммунный ответ против M2e был намного слабее. Уровень антител к M2e был статистически выше контроля в случае белка HEV 110-610/M2e(485) ( $p < 0.01$ ), а для белка M2 HEV 110–610 наблюдалось лишь незначительное отличие уровня титра антител от контроля.

*Экспрессия в растениях капсидного белка вируса гепатита E с присоединенным RBD белка S коронавируса SARS-CoV-2.*

Мы использовали капсидный белок вируса гепатита E также для презентации рецептор связывающего домена (RBD) белка S коронавируса SARS-CoV-2, который является мишенью для вируснейтрализующих антител и используется для разработки вакцин от COVID-19 [Walls *et al.*, 2020; Wrapp *et al.*, 2020; Lan *et al.*, 2020; Dai *et al.*, 2020].

Последовательность RBD белка S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 (GenBank QJE37812.1) с 319 по 524 аа, фланкированная с двух сторон гибкими линкерами GGGSG для лучшего фолдинга белков, была включена в HEV110-610 после Tyr485.

Последовательность, кодирующая гибридный белок HEV/RBD была клонирована в экспрессионных векторах pEff и pAeff (рис. 4.5.22). Вектор pAeff содержит последовательность сигнального пептида на N-конце и HDEL последовательность на C-конце, что приводит к накоплению белка в эндоплазматическом ретикулуме. Накопление белка в различных компартментах растительной клетки может влиять на свойства белка, его стабильность и растворимость, а также на финальный выход.

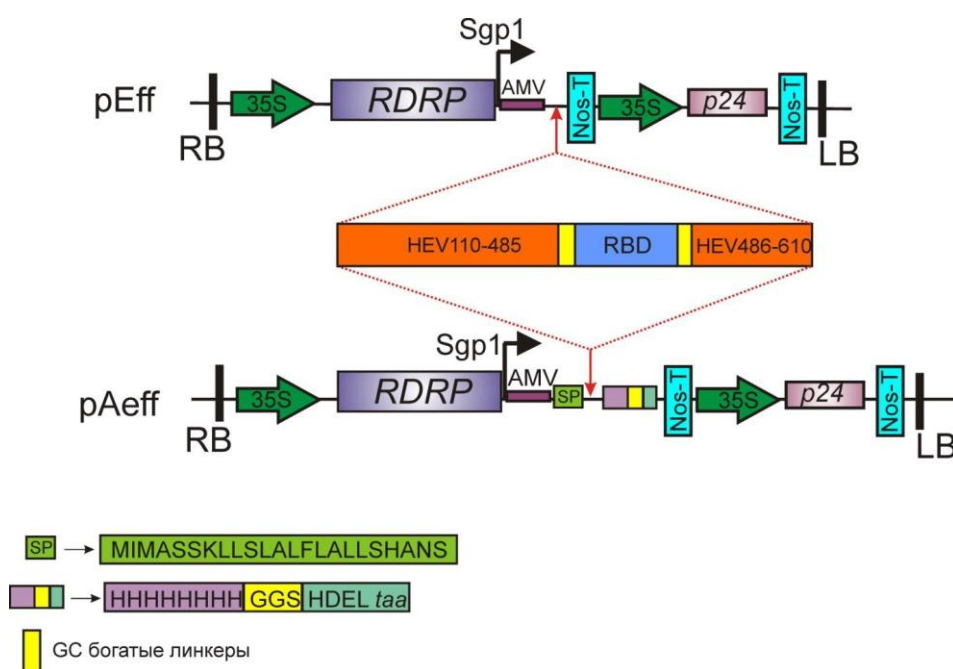


Рисунок 4.5.22. Структура экспрессионных векторов. Показаны области Т-ДНК рекомбинантных бинарных векторов: HEV, последовательность ORF2 вируса гепатита E; RBD, последовательность RBD SARS-CoV-2 с 319 по 524 аа, соответствующая штамму Wuhan-Hu-1; SP, сигнальный пептид.

Для экспрессии HEV/RBD в растениях *N. benthamiana* соответствующие векторы переносили в клетки *A. tumefaciens* GV3101 с помощью электропорации. Векторы вводили в клетки растений с помощью агроинфильтрации. Препараты суммарных растительных белков и

растворимых белков выделяли и анализировали с помощью вестерн-блоттинга на 3 – 4 сутки после инфильтрации (рис. 4.5.23).

Белок HEV/RBD экспрессировался на уровне 80–100 мкг на 1 грамм листьев. Он был преимущественно нерастворим, но доля HEV/RBD в растворимой фракции при использовании вектора pAeff была больше по сравнению с pEff, что существенно для выделения вирусоподобных частиц из растений-продуцентов. Поэтому в дальнейшем для экспрессии HEV/RBD использовали вектор pAeff (рис. 4.5.24).

Очистку рекомбинантного белка проводили с помощью металл-аффинной хроматографии с использованием Ni сорбента в нативных условиях. Финальный выход препарата HEV/RBD, выделенного из растворимой фракции растительных белков, составил 20 мкг на 1 грамм листьев.

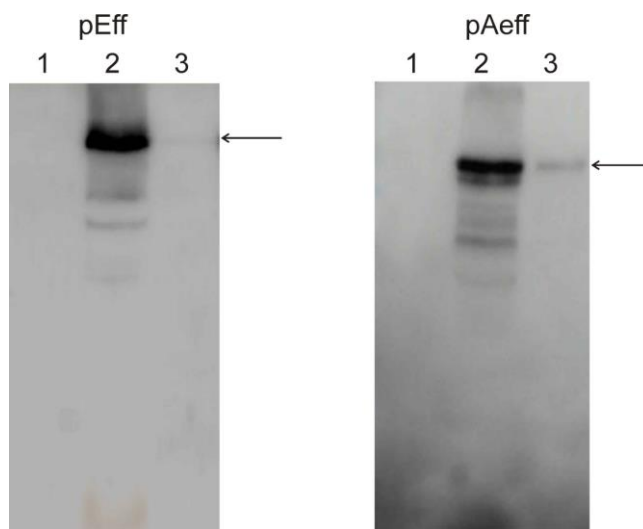


Рисунок 4.5.23. Вестерн-блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов; 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфильтрированного pAeff или pEff, кодирующего HEV/RBD; 3, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфильтрированного pAeff или pEff, кодирующего HEV/RBD. Позиция HEV/RBD показана стрелкой.

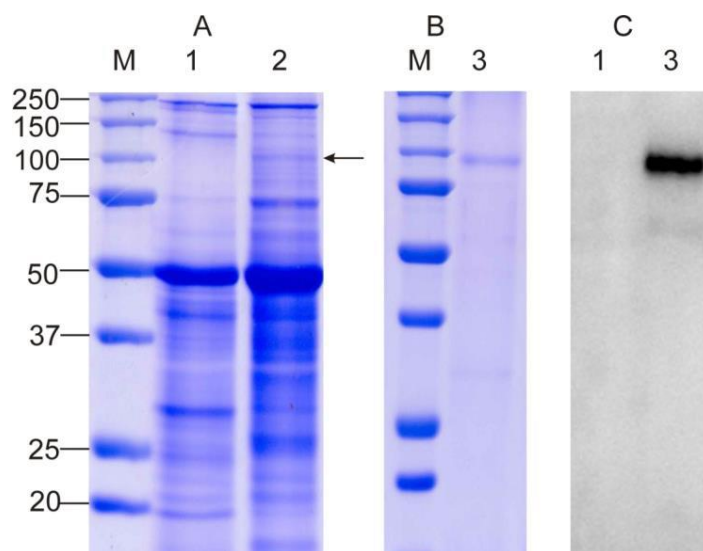


Рисунок 4.5.24. Экспрессия HEV/RBD в *N. benthamiana* с использованием вектора pAeff-HEV/RBD. SDS-PAGE (A, B) и вестерн блоттинг (C) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов; M, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрованного листа; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфильтрованного pAeff-HEV/RBD; 3, очищенный препарат HEV/RBD. Позиция HEV/RBD показана стрелкой.

Структуру частиц, образованных HEV/RBD, анализировали методом атомно-силовой микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии (рис. 4.5.33). По данным атомно-силовой микроскопии частицы имеют размер  $40 \pm 4$  нм. С помощью электронной микроскопии размер частиц оценивается в  $33 \pm 4$  нм. Частицы HEV/RBD имеют сферическую форму.

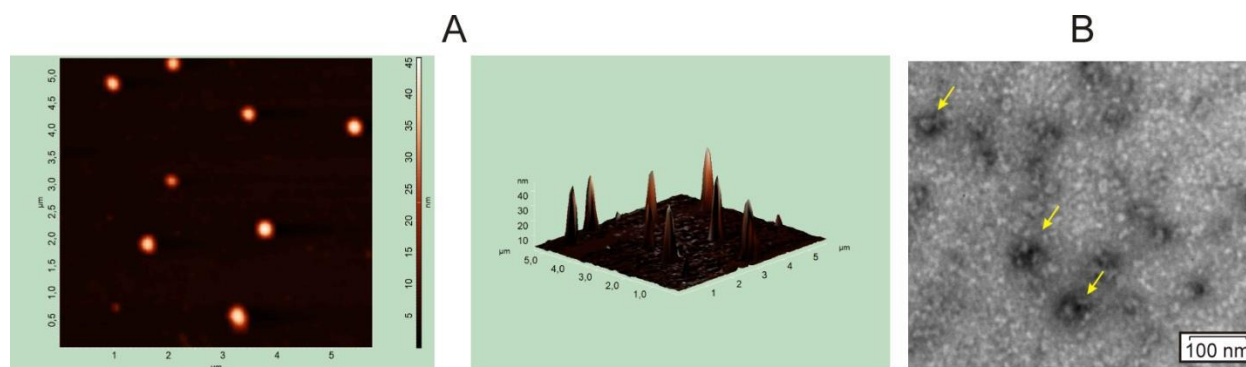


Рисунок 4.5.25. Анализ структуры выделенных из растений-продуцентов частиц с помощью атомно-силовой (A) и электронной микроскопии (B).

Мы проанализировали, могут ли частицы HEV/RBD распознаваться человеческими антителами. Было протестировано 24 образца сывороток



пациентов, переболевших COVID-19 (ПЦР-положительные), с помощью ИФА. В качестве отрицательного контроля использовали 10 образцов сывороток пациентов, собранных до пандемии (2016–2018 гг.). Все образцы сывороток были отрицательными в ИФА при использовании HEV110-610 в качестве антигена. ИФА показал, что 15 из 24 образцов сывороток пациентов, перенесших COVID-19, были положительными при использовании HEV/RBD в качестве антигена (рис. 4.5.26). Это означает, что антитела, вырабатываемые у пациентов с COVID-19, могут связывать полученные в растениях HEV/RBD частицы, что позволяет предположить, что RBD доступен для антител и, вероятно, экспонируется на поверхности частиц.

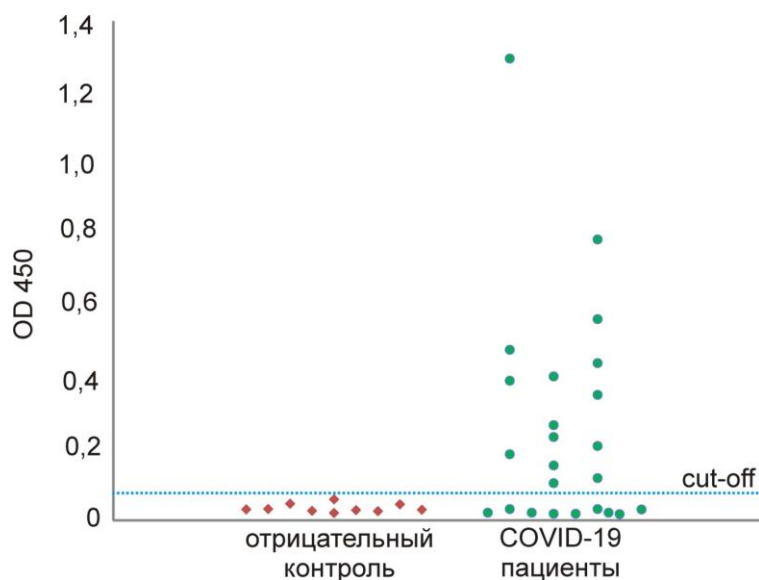


Рисунок 4.5.26. Вирусоподобные частицы HEV/RBD, полученные в растительной системе экспрессии, узнаются IgG из сывороток пациентов, перенесших COVID-19 (n = 24). Результаты представлены в виде значения оптической плотности (OD 450) анализируемых сывороток. Сыворотки разводили 1:80. Пороговое значение (cut-off = 0,059), обозначено пунктирной линией).

### Заключение

1. Рекомбинантные белки HEV 110-610, M2 HEV 110–610 и HEV 110-610/M2e(485) эффективно экспрессируются в *N. benthamiana* на уровне ~ 300  $\mu\text{g}$  с 1 г, являются растворимыми, выделяются с помощью металл-аффинной



хроматографии с конечным выходом 150 – 200  $\mu\text{g}$  с 1 г биомассы листа. Все белки формируют вирусоподобные частицы размером 30-50 нм. Иммунизация мышей данными препаратами приводит к выработке специфических IgG антител к HEV на высоком уровне, однако, иммунный ответ против M2e был слабым. Возможно, что это связано с включение в гибридный белок только одной копии M2e и/или неоптимальной презентацией M2e на поверхности частиц. Улучшение иммуногенных свойств рекомбинантных белков может быть достигнуто за счет использования нескольких копий M2e пептида.

2. Рекомбинантный белок HEV/RBD, содержащий RBD белка S коронавируса SARS-CoV-2, интегрированный в капсидный белок вируса гепатита E, синтезируются в *N. benthamiana* на уровне ~ 80–100 мкг с 1 г листа, является частично растворимыми, выделяются с помощью металл-аффинной хроматографии в нативных условиях из растворимой фракции с конечным выходом ~ 20 мкг с 1 г биомассы листа. Белок формируют вирусоподобные частицы размером 30-50 нм. Антитела, вырабатываемые у пациентов с COVID-19, могут связываться с HEV/RBD частицами, что указывает на расположение RBD на поверхности частицы. Рекомбинантный белок HEV/RBD может стать основой для разработки вакцин и диагностикумов для COVID-19.

#### 4.6. Экспрессия в растениях антигенов коронавируса SARS-CoV-2.

В 2019 году началась наиболее серьезная пандемия за последние 100 лет, которая была вызвана новым коронавирусом SARS-CoV-2. Поэтому разработка эффективных диагностических средств и вакцин является актуальной задачей.

Гликопротеин S и его фрагменты считаются лучшими кандидатами на создание рекомбинантных вакцин против SARS-CoV-2 и диагностикумов. В данной работе нами были использованы три варианта антигенов SARS-CoV-2: полноразмерный белок S1 (начиная с 15 аа), его рецептор-связывающий домен, RBD (319-541 а.о.) и укороченный вариант RBD (319-524 а.о.).

*Создание фитовирусных векторов для экспрессии антигенов SARS-CoV-2 в растениях.*

Последовательности различных участков гена S1 белка (рис. 4.6.1) были получены с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиду, содержащую последовательность кДНК S белка вируса SARS-CoV2 (изолят Wuhan-Hu-1, GenBank: QJE37812.1).

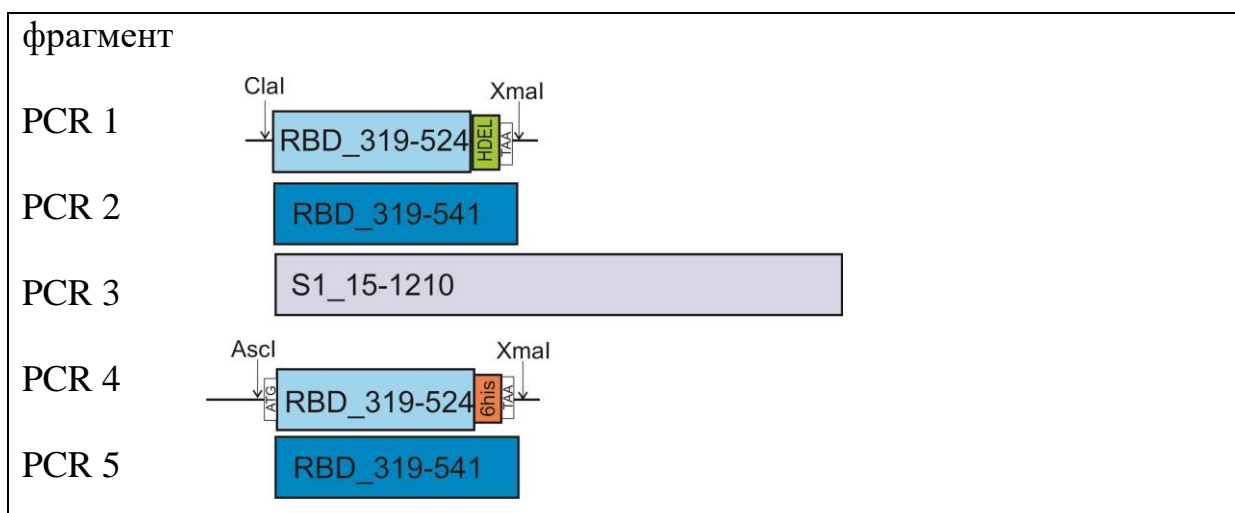


Рисунок 4.6.1. Используемые в работе фрагменты S1 белка SARS-CoV-2.

Фрагменты PCR1, PCR2, PCR3 клонировали в вектор pEff-SP, кодирующий сигнальный пептид, направляющий белок в ЭР и сигнал удержания в ЭР (рис. 4.6.2), а фрагменты PCR4 и PCR5 клонировали в вектор pEff-GFP (рис. 4.6.3).

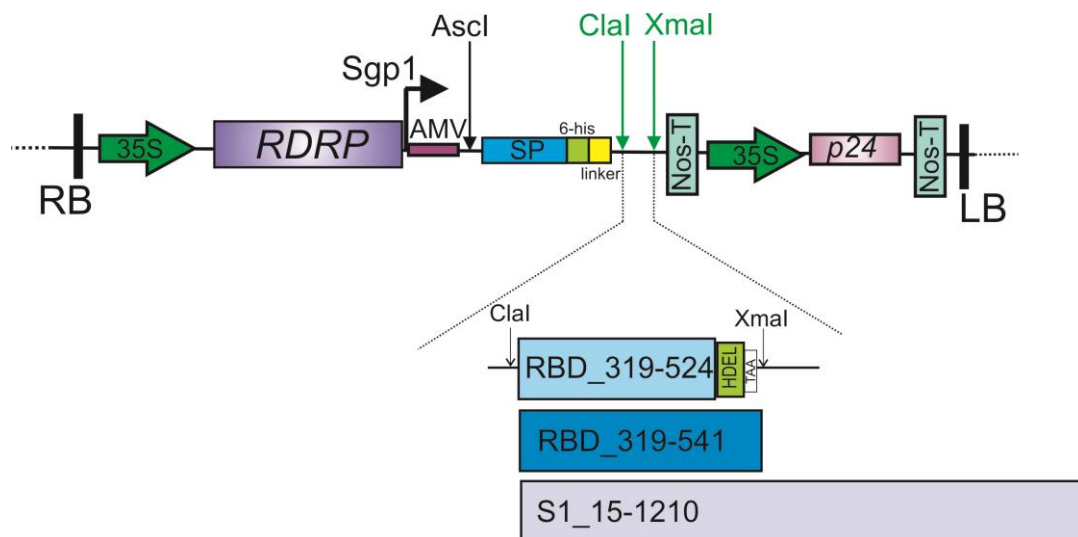


Рисунок 4.6.2. Структура экспрессионных векторов. Показаны области Т-ДНК рекомбинантных бинарных векторов: SP – сигнальный пептид; 6-his – шесть гистидинов; RBD\_319-524, RBD\_319-541, RBD\_15-1210 – последовательности S1 белка вируса SARS-Cov2. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

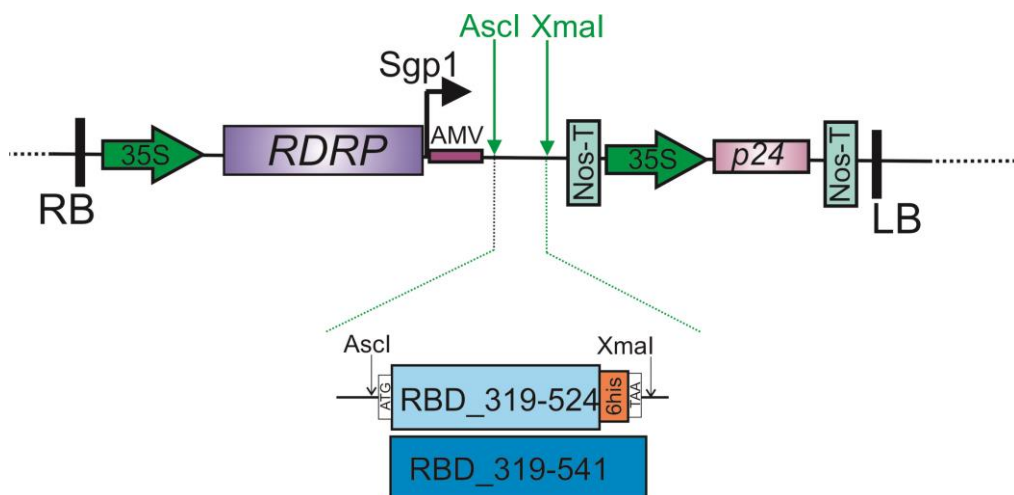


Рисунок 4.6.3. Структура экспрессионных векторов. Показаны области Т-ДНК рекомбинантных бинарных векторов: RBD\_319-524, RBD\_319-541 – последовательности S1 белка вируса SARS-Cov2. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

### Экспрессия белков SARS-CoV-2 в *N. benthamiana*.

Для экспрессии белков SARS-CoV-2 в *N. benthamiana* соответствующие векторы переносили в клетки *A. tumefaciens* GV3101 с помощью электропорации. Векторы вводили в клетки растений с помощью агроинfiltrации. На вторые сутки после infiltration в зонах агроинfiltrации начинали появляться признаки некроза для всех векторов (рис. 4.6.4). Препараты суммарных белков и растворимых белков выделяли из растений и анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга на 3 – 4 сутки после infiltration (до появления генерализованного некроза) (рис. 4.6.5). Однако SDS-PAGE и вестерн блоттинг не позволили выявить целевые белки в листьях растений-продуцентов, как в растворимой фракции, так и в суммарном белковом препарате (рис. 4.6.5).



Рисунок 4.6.4. Растение *N. benthamiana*, инfiltrированное агробактериями, содержащими экспрессионные векторы, кодирующие S1 и RBD SARS-Cov-2 через 4 суток после infiltration.

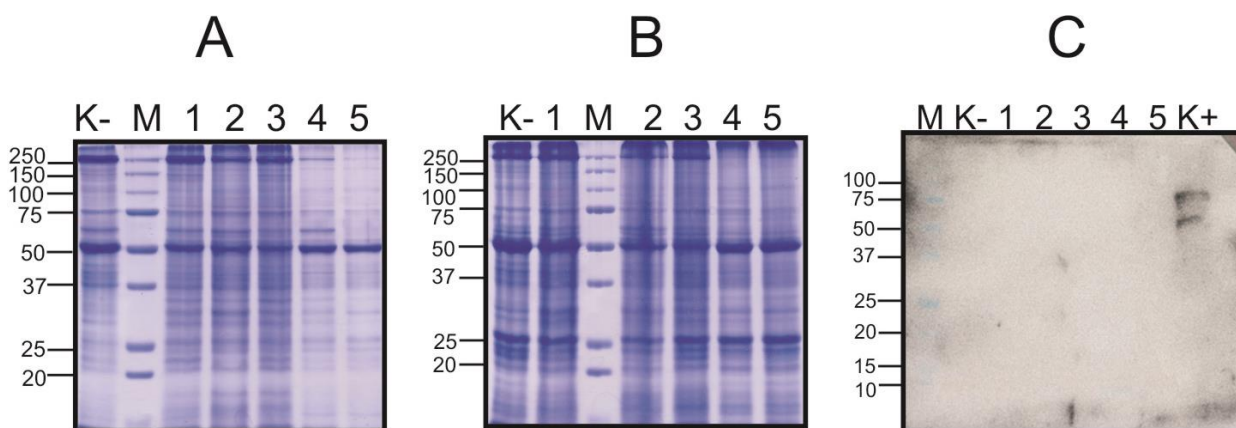


Рисунок 4.6.5. SDS-PAGE (А, В) и вестерн блоттинг (С) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов.

М, маркер молекулярного веса (кДа); К-, препарат белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 1, препарат белка, выделенного из листа, инфильтрированного рEff-SP-RBD\_319-524 (27 кДа); 2, препарат белка, выделенного из листа, инфильтрированного рEff-SP-RBD\_319-541 (29 кДа); 3, препарат белка, выделенного из листа, инфильтрированного рEff-SP-S1\_15-1210 (137 кДа); 4, препарат белка, выделенного из листа, инфильтрированного рEff-RBD\_319-524 (24 кДа); 5, препарат белка, выделенного из листа, инфильтрированного рEff-RBD\_319-541 (26 кДа); К+, препарат рекомбинантного белка Flg-RBD, выделенный из штамма-продуцента *E.coli*.

(А) – фракция растворимых белков; (В), суммарный белок из инфильтрированных листьев; (С), вестерн блоттинг суммарных белковых препаратов, для детекции использовали сыворотку пациента, привитого вакциной Спутник V.

Также мы выделили препараты белков, экспрессированных с помощью векторов рEff-RBD\_319-524 и рEff-SP-RBD\_319-524, с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni сорбенте из большего объема листьев (7 g листьев для рEff-RBD\_319-524 и 21 g для рEff-SP-RBD\_319-524). Выделение производили в денатурирующих условиях в 6М гуанидин гидрохлориде. Очищенные препараты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга (рис. 4.6.6). Полученные результаты показывают, что белок экспрессируется в растениях и может быть выделен с помощью металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Дополнительно с

целевым белком выделяется RuBisCO (полоса в районе 30 кД на Рис. 4.6.6, панель А).

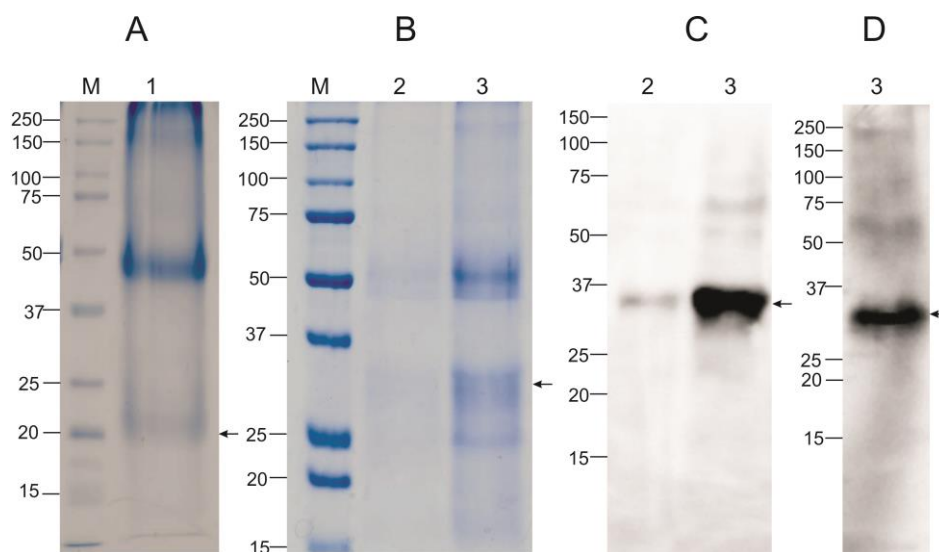


Рисунок 4.6.6. SDS-PAGE (А, В) и вестерн блоттинг (С, D) очищенного препарата RBD\_319-524, выделенного из листьев *N. benthamiana*, инфильтрированных pEff-RBD\_319-524 (дорожка 1) и pEff-SP-RBD\_319-524 (дорожки 2, 3). На дорожке 3 нанесено в 8 раз больше препарата RBD\_319-524, чем на дорожке 2 (белок был сконцентрирован с использованием колонок Amicon Ultra 10 K). М, маркер молекулярного веса (кДа). Используются моноклональные антитела на 6-his таг (панель С) или моноклональные антитела к RBD (панель D).

Выход очищенного белка RBD\_319-524 составил  $\sim 15 \mu\text{g/g}$  листа, что близко к результатам двух других работ, в которых RBD фрагмент экспрессировали в растениях с конечным выходом  $8 \mu\text{g/g}$  листа [Kaewta Rattanapisit *et al.*, 2020], и  $10\text{-}20 \mu\text{g/g}$  листа с различными аффинными тагами [Mamedov *et al.*, 2020].

Достигнутый уровень экспрессии является низким и не позволяет получать практически-значимые количества антигена. Поэтому для повышения уровня экспрессии мы присоединили пептид RBD\_319-524 к носителю, эффективно экспрессирующемуся в растениях. В качестве такого носителя был использован бактериальный флагеллин. Флагеллин является мукозальным адъювантом, что открывает перспективы ведения гибридных вакцинных белков на его основе интраназально.

Экспрессия гибридного белка, включающего флагеллин и RBD\_319-524, в цитозоле.

Ген гибридного белка Flg-RBD, представляющего собой флагеллин с присоединенным к его С-концу RBD\_319-524 клонировали в векторе pEff-GFP, аналогично тому, как это было сделано при экспрессии антигенов вируса гриппа, присоединенных к флагеллину. На рисунке 4.6.7 представлена схема соответствующего вектора.

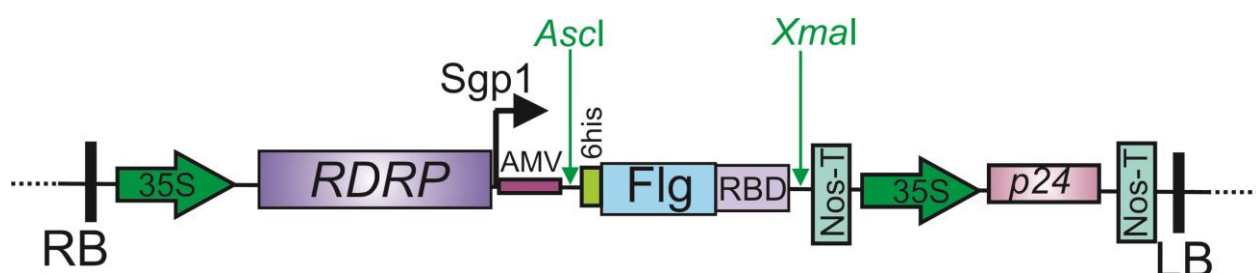


Рисунок 4.6.7. Структура экспрессионного вектора pEff\_Flg-RBD. RBD – последовательность RBD SARS-CoV-2 с 319 по 524 aa; Flg – флагеллин.

Для экспрессии белка Flg-RBD в *N. benthamiana* вектор переносили в клетки *A. tumefaciens* GV3101 с помощью электропорации. Вектор вводили в клетки растений с помощью агроинfiltrации.

Препараты суммарных белков и растворимых белков выделяли из листьев растений-продуцентов на 3 – 4 сутки после infiltration и анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга (рис. 4.6.8). Следует отметить, что такого стремительно появляющегося некроза, как при экспрессии RBD\_319-524 без белка-носителя, не наблюдалось. По результатам вестерн блоттинга можно сделать вывод, что экспрессированный в растениях белок Flg-RBD нерастворим. Белок экспрессируется на уровне ~ 110 – 120  $\mu\text{g}$  на 1 г ткани листа.

Очистку белка Flg-RBD производили в денатурирующих условиях в 6М GuHCl. Стадию отмывки производили в 8М мочеvine. После выделения



препарат диализовали против PBS. Очищенные препараты анализировали с помощью SDS-PAGE (рис 4.6.9) и вестерн блоттинга (рис. 4.6.10). Выход белка после очистки составлял 90 – 100  $\mu\text{g}$  с 1 г. Данный уровень значительно превышает эффективность экспрессии RBD без белка-носителя.

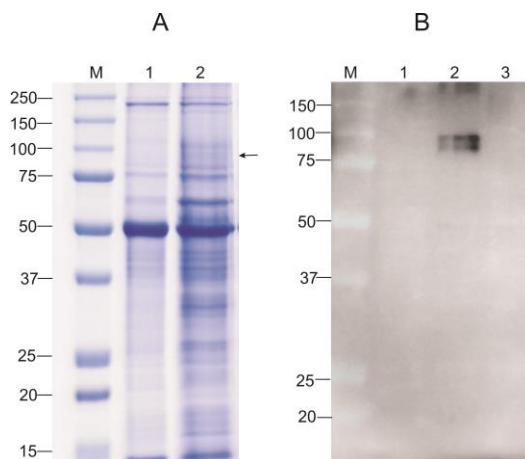


Рисунок 4.6.8. SDS-PAGE (A) и вестерн блоттинг (B) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов.

M, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфильтрированного pEff\_Flg-RBD; 3, препарат растворимого растительного белка, выделенного из листа, инфильтрированного pEff\_Flg-RBD.

Контрольный флагеллин без RBD (Flg) экспрессировали в растениях с помощью pEff вектора и выделяли из растений аналогично белку Flg-RBD.

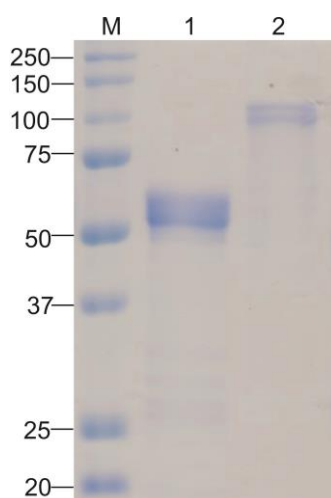


Рисунок 4.6.9. SDS-PAGE очищенных белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов. M, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат Flg; 2, препарат Flg-RBD.



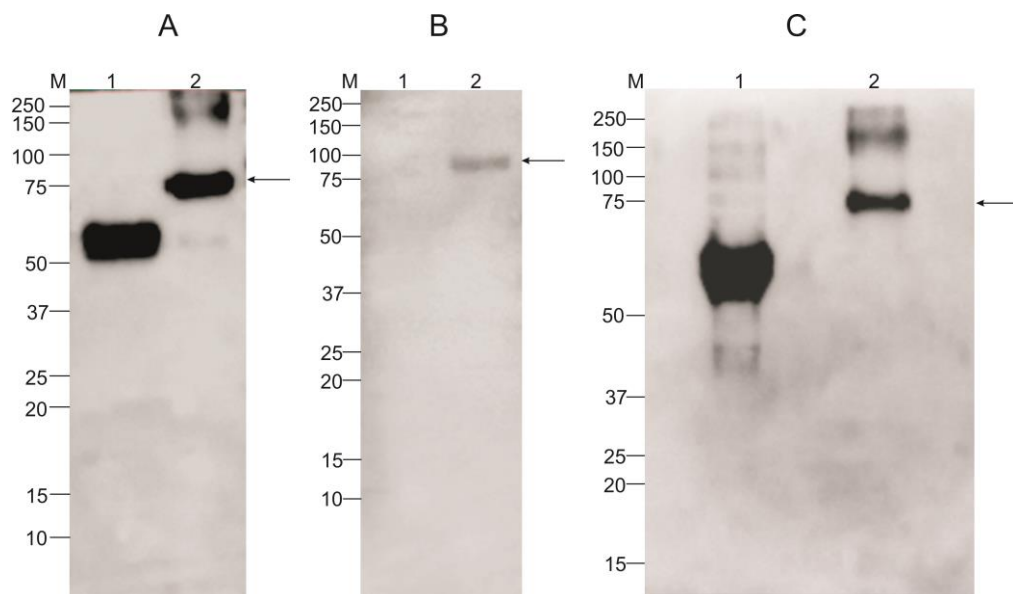


Рисунок 4.6.10. Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат Flg; 2, препарат Flg-RBD. Используются: (А) моноклональные антитела к 6-his тагу; (В), моноклональные антитела к RBD; (С), поликлональные антитела к Flg.

*Экспрессия гибридного белка Flg-RBD, направленного в эндоплазматический ретикулум.*

Так как RBD содержит функционально-значимые сайты гликозилирования, на следующем этапе Flg-RBD клонировали в векторе pEff-SP. При использовании данного вектора синтезируемый белок имеет в своей последовательности сигнальный пептид для таргетинга в эндоплазматический ретикулум и HDEL последовательность локализации в эндоплазматическом ретикулуме. Поскольку гликозилирование осуществляется в эндоплазматическом ретикулуме, мы предполагали, что направление белка Flg-RBD в этот компартмент позволит получать его в гликозилированной форме. Кроме того, удержание в ЭР может позволить повысить выход белка за счет его защиты от действия протеаз. На рис. 4.6.11. представлена схема вектора pEff-SP\_Flg-RBD.

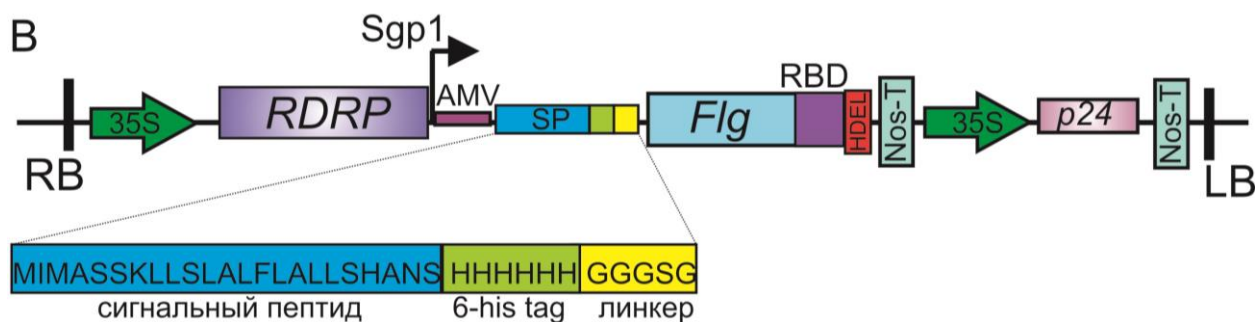


Рисунок 4.6.11. Структура экспрессионного вектора pEff-SP\_Flg-RBD. RBD – последовательность RBD SARS-CoV-2 с 319 по 524 aa; Flg – флагеллин; LB и RB – левая и правая границы T-ДНК.

Для сравнения двух систем экспрессии векторами pEff\_Flg-RBD и pEff-SP\_Flg-RBD инфильтрировали растения таким образом, что на одном листе одновременно находились зоны инфильтрации для двух векторов. Препараты суммарных белков и растворимых белков выделяли из инфильтрированных листьев на 3 – 4 сутки после инфильтрации и анализировали с помощью вестерн блоттинга (рис. 4.6.12).

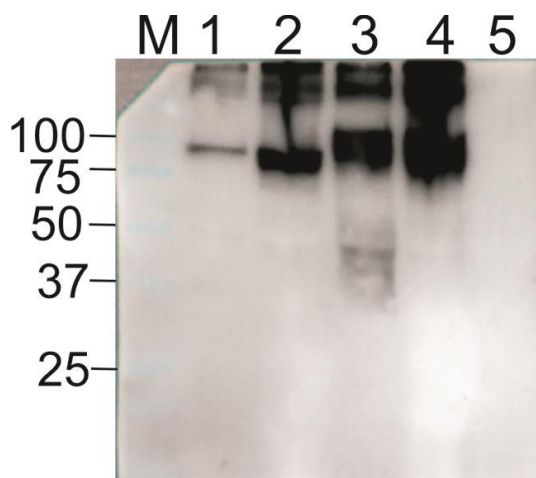


Рисунок 4.6.12. Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов.

M, маркер молекулярного веса (kDa); 1, препарат растворимых растительных белков из листьев, инфильтрированных вектором pEff-Flg-RBD\_319-541; 2, препарат суммарных белков из листьев, инфильтрированных вектором pEff-Flg-RBD\_319-541; 3, препарат растворимых белков из листьев, инфильтрированных вектором pEff-SP-Flg-RBD\_319-541; 4, препарат суммарных белков из листьев, инфильтрированных вектором pEff-SP-Flg-RBD\_319-541; 5, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрированного листа. Для детекции использовались мышинные поликлональные антитела к Flg.

Из полученных данных можно сделать вывод, что при использовании вектора pEff без сигнального пептида и HDEL последовательности белок Flg-RBD синтезируется в меньшем количестве и преимущественно нерастворим, в то время как при использовании вектора pEff-SP уровень экспрессии выше, а белок присутствует преимущественно в растворимой фракции.

*Экспрессия гибридных белков, включающих RBD совместно с M2e пептидом вируса гриппа.*

Вирус гриппа А и коронавирус SARS-CoV-2 являются актуальными патогенами с точки зрения разработки бивалентных вакцин. Пептид M2e вируса гриппа А рассматривается как антиген для разработки рекомбинантных «универсальных» вакцин против гриппа, тогда как RBD коронавируса является перспективным антигеном для вакцин от SARS-CoV-2. Комбинация антигенов вируса гриппа А и SARS-CoV-2 в одном вакцинном препарате может позволить быстро и эффективно предотвращать эти заболевания. Поэтому мы исследовали возможность экспрессии в растениях гибридных белков, включающих оба эти антигена.

S белок SARS-CoV-2 имеет 22 потенциальных сайта N-гликозилирования (N-X-S/T, где X может быть любой аминокислотой, кроме P). Область RBD содержит два экспериментально подтвержденных сайта N-гликозилирования (N331 и N343) [Shajahan *et al.*, 2020; Watanabe *et al.* 2020]. N-гликаны важны для фолдинга белков и их функционирования [Shin *et al.*, 2021]. Для получения гликозилированных вариантов рекомбинантных белков мы использовали стратегию направления белков в эндоплазматический ретикулум, в котором происходит первый этап гликозилирования, универсальный для растений и животных.

В качестве антигенов мы использовали четыре копии M2e пептида вируса гриппа А и RBD штамма SARS-CoV-2 Delta (с 319 по 541 aa). Антигены были экспрессированы как отдельно, так и с носителем – флагеллином.

Для экспрессии рекомбинантных белков использовали вектор pAeff, кодирующий последовательность сигнального пептида для таргетинга в ЭР на N-конце и HDEL последовательность на C-конце, что приводит к накоплению белка в ЭР (рис. 4.6.13). Последовательность RBD штамма Delta была оптимизирована для экспрессии в *N. benthamiana*. Для обеспечения корректного фолдинга белков в состав генов были введены последовательности, кодирующие глицин-сериновые “гибкие” линкеры. Флагеллин от RBD был отделен линкером 19S. На C-конце белков содержится последовательность 8 гистидинового тага для очистки с помощью металл-аффинной хроматографии.

Было получено четыре экспрессионных вектора, кодирующих (i) RBD штамма Delta (319 – 541 aa), RBD<sub>delta</sub>; (ii) RBD<sub>delta</sub>-4M2e, представляющий собой RBD<sub>delta</sub> с четырьмя тандемными копиями M2e пептида (две копии консенсусной последовательности M2e человека (M2eh) и две копии M2e пандемического штамма вируса гриппа A/H1N1pdm09 (M2es), расположенные в порядке M2eh-M2es-M2eh-M2es), (iii) флагеллин с RBD<sub>delta</sub>; (iv) флагеллин с RBD<sub>delta</sub>-4M2e (рис. 4.6.13).

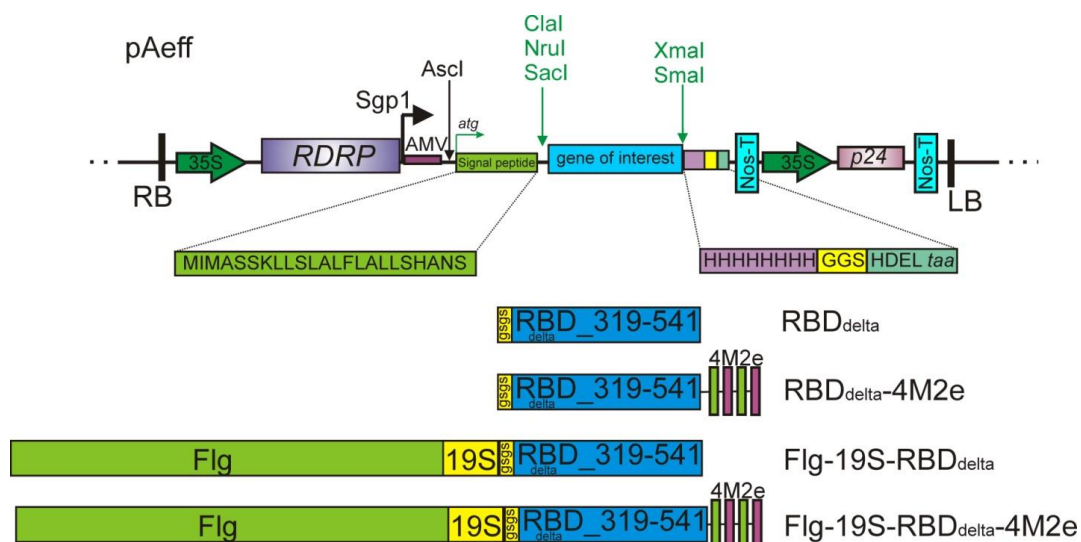


Рисунок 4.6.13. Структура экспрессионных векторов. Показаны области Т-ДНК рекомбинантных бинарных векторов.

Для экспрессии белков в *N. benthamiana* соответствующие векторы переносили в клетки агробактерий *A. tumefaciens* GV3101 и вводили в клетки растений с помощью агроинfiltrации. Препараты суммарных белков и растворимых белков выделяли и анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга на 3 – 4 сутки после infiltration (рис. 4.6.14).

Анализ суммарной и растворимой фракций белков показал, что RBD<sub>delta</sub>-4M2e присутствовал преимущественно в нерастворимой фракции, в то время как белки RBD<sub>delta</sub>, Flg-19S-RBD<sub>delta</sub> и Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e были растворимыми (рис. 4.6.15). Эффективность экспрессии гибридных белков, содержащих флагеллин в качестве носителя, составила 100–150 мкг на 1 грамм листьев, RBD<sub>delta</sub> – 50–60 мкг на 1 грамм листьев, RBD-4M2e – около 150 мкг на 1 грамм листьев (до очистки).

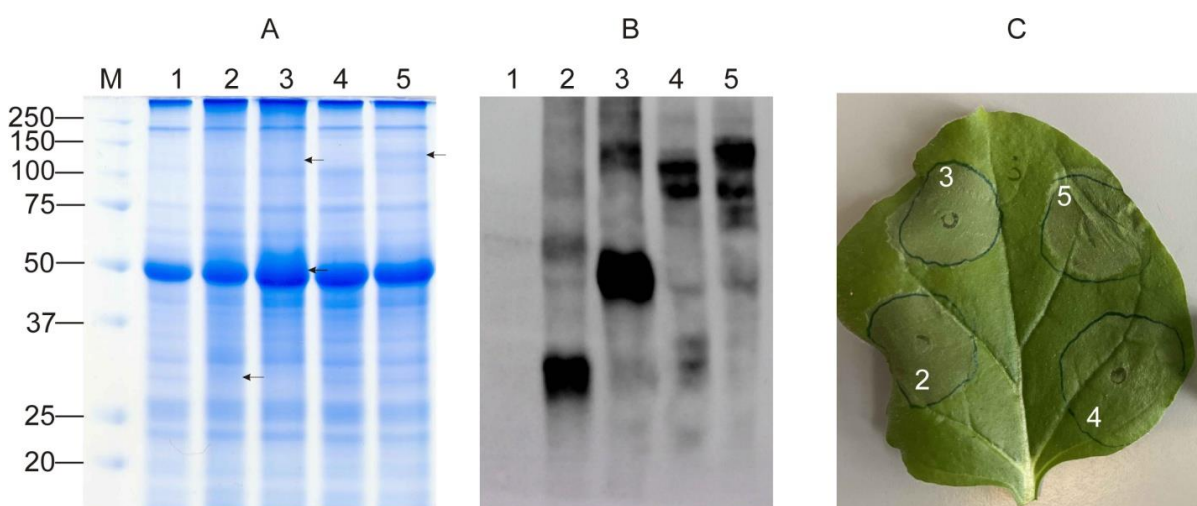


Рисунок 4.6.14. SDS-PAGE (A) и вестерн блоттинг (B) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов; Фото листа на 4 сутки после infiltration агробактериями, несущими рекомбинантные векторы (C).

М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинfiltrированного листа; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, infiltration рAeff-RBD<sub>delta</sub> (30 кДа); 3, препарат суммарного белка, выделенного из листа, infiltration рAeff-RBD<sub>delta</sub>-4M2e (43 кДа); 4, препарат суммарного белка, выделенного из листа, infiltration рAeff-Flg-19S-RBD<sub>delta</sub> (83 кДа); 5, препарат суммарного белка, выделенного из листа, infiltration рAeff-Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e (95 кДа); (B), вестерн блоттинг суммарных белковых препаратов проводили с использованием моноклональных антител на RBD.

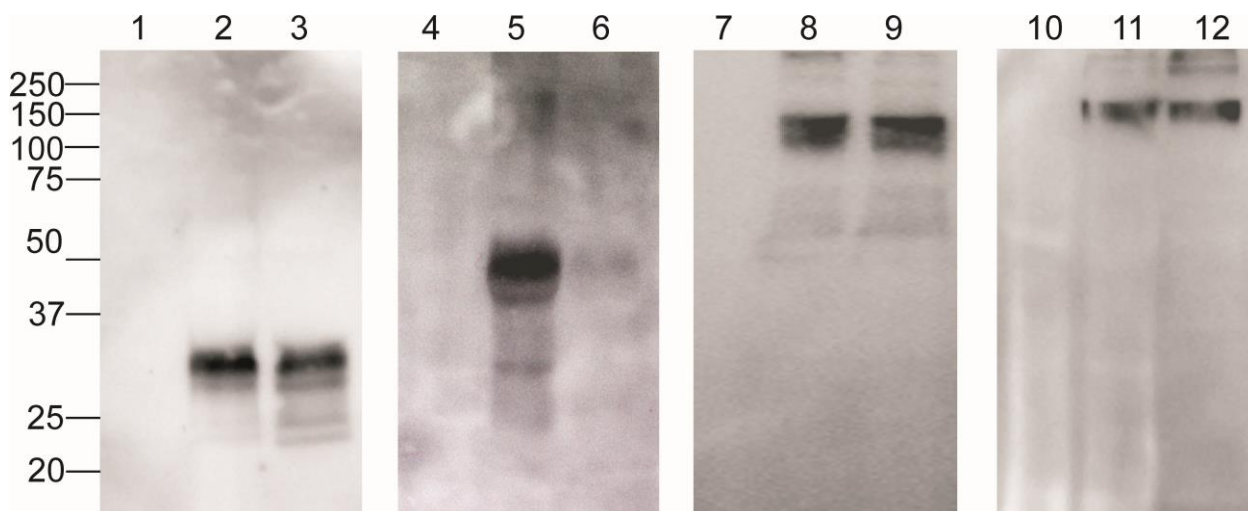


Рисунок 4.6.15. Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов;

1, 4, 7, 10, препараты суммарных белка, выделенных из неинфильтрированных листьев; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-RBD}_{\text{delta}}$ ; 3, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-RBD}_{\text{delta}}$ ; 5, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-RBD}_{\text{delta}}\text{-4M2e}$ ; 6, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-RBD}_{\text{delta}}\text{-4M2e}$ ; 8, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-Flg-19S-RBD}_{\text{delta}}$ ; 9, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-Flg-19S-RBD}_{\text{delta}}$ ; 11, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-Flg-19S-RBD}_{\text{delta}}\text{-4M2e}$ ; 12, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфицированного  $\text{pAeff-Flg-19S-RBD}_{\text{delta}}\text{-4M2e}$ . Вестерн блоттинг белковых препаратов проводили с использованием моноклональных антител на RBD (дорожки 1 – 6) или поликлональных антител на Flg (дорожки 7 – 12).

Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью металл-аффинной хроматографии с использованием Ni сорбента в нативных или денатурирующих условиях в соответствии с их растворимостью. Белки на основе флагеллина очищали в денатурирующих условиях для предотвращения протеолитической деградации. Полученные белки диализовали против PBS, после диализа все белки оставались растворимыми. Финальный выход очищенного препарата  $\text{RBD}_{\text{delta}}$  составил 20 мкг на 1 грамм листьев, что сопоставимо с опубликованными данными [Mamedov *et al.*, 2021]. Выход после очистки рекомбинантных белков  $\text{RBD}_{\text{delta}}\text{-4M2e}$ , Flg-19S-



RBD<sub>delta</sub> и Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e составляя 60, 60 и 90 мкг на 1 грамм листьев, соответственно (рис. 4.6.16 А).

RBD содержит два экспериментально подтвержденных сайта N-гликозилирования, N331 и N343, которые полностью гликозилированы при экспрессии в гетерологичных системах экспрессии [Shajahan *et al.*, 2020; Watanabe *et al.* 2020; Antonopoulos *et al.*, 2021]. Поэтому рекомбинантные белки RBD<sub>delta</sub>-4M2e, Flg-19S-RBD<sub>delta</sub> и Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e анализировали на наличие гликанов для подтверждения их гликозилирования *in vivo*. N-гликаны были обнаружены во всех трех рекомбинантных белках, полученных в растениях (рис. 4.6.16 В).

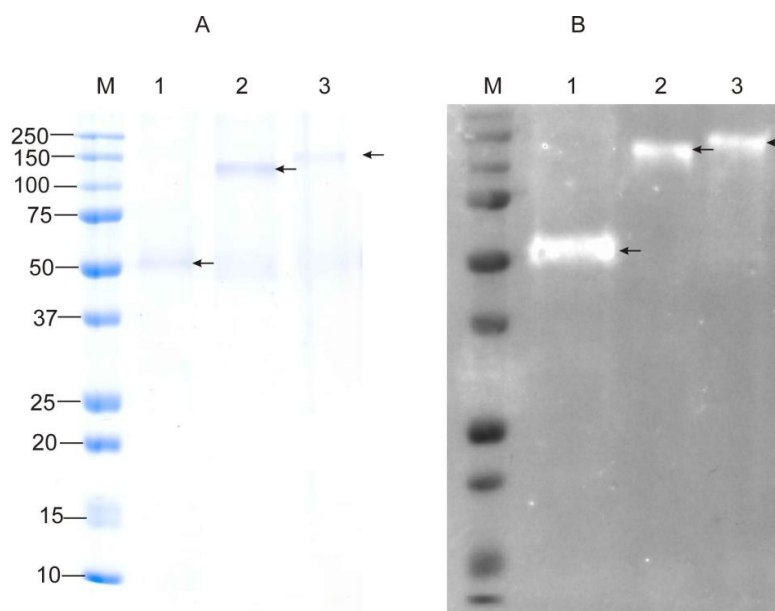


Рисунок 4.6.16. SDS-PAGE анализ очищенных белков (А) и анализ их гликозилирования с помощью набора Pro Q<sup>®</sup> Emerald 300 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit (Invitrogen) (В). М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, очищенный препарат RBD<sub>delta</sub>-4M2e; 2, очищенный препарат Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>; 3, очищенный препарат Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e. Гликозилирование проявляется в «осветлении» соответствующей полосы на фотографии геля.

### Заключение

Мы показали, что белки RBD<sub>delta</sub> и RBD<sub>delta</sub>-4M2e, а также их гибриды с флагеллином *S. typhimurium*, могут быть получены в растительной системе экспрессии. Направление белков в эндоплазматический ретикулум обеспечивает продукцию белков в гликозилированной форме. Белок Flg-19S-

RBD<sub>delta</sub>-4M2e, полученный в растениях, может быть использован для разработки рекомбинантной бивалентной вакцины против гриппа А и COVID-19, которую можно применять интраназально. Более того, благодаря наличию консервативного пептида M2e такая вакцина должна быть эффективна против широкого спектра штаммов гриппа А. Индукция иммунного ответа в носоглотке важна для профилактики респираторных заболеваний, которыми являются гриппа и COVID-19, поскольку она может предотвращать локальное распространение инфекции.



## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

### 5.1. Растения как биофабрики

Для получения рекомбинантных белков могут быть использованы различные системы гетерологичной экспрессии, – бактерии, дрожжи, растения, клетки насекомых или млекопитающих. Растения могут стать конкурентоспособной «биофабрикой» для получения рекомбинантных белков.

Первоначально в качестве продуцентов использовали трансгенные растения, создание которых для большинства видов является длительным процессом, а выход рекомбинантного белка обычно низок. Впоследствии для экспрессии белков в растениях были разработаны альтернативные подходы, основанные на использовании рекомбинантных вирусов растений (в их геном интегрируется ген, кодирующий целевой белок), доставка которых в клетки обычных нетрансгенных растений осуществляется с помощью агробактерий. Такая транзистная экспрессия позволяет получить в растениях целевой белок в течение нескольких дней, причем уровень продукции существенно превышает типичный для трансгенных растений и может превышать 1 мг/гр ткани листа, что соответствует примерно 30% общего растворимого белка [Kopertekh and Schiemann, 2017].

Применение метода транзистной экспрессии в растениях имеет ряд преимуществ по сравнению с альтернативными системами для получения рекомбинантных белков:

- Быстрота – в течение нескольких недель можно получить готовый продукт.
- Стоимость культивирования растений невысока, поскольку оно не требует дорогостоящих сред и оборудования. Выращивание растений легко масштабируется.
- При работе с растениями не требуется сложное оборудование, а все манипуляции достаточно простые.

- Наличие у растений посттрансляционных модификаций, свойственных эукариотам (но имеются и отличия от млекопитающих).
- Использование растений исключает риск передачи человеку патогенов или токсинов.

Канадская компания Medicago, основанная в 1999 году, активно работает по созданию вакцинных препаратов в растительной системе экспрессии (рис. 5.1). В 2020 году завершились масштабные клинические испытания вакцины от гриппа [Ward *et al.*, 2020]. В данный момент препарат проходит стадию регистрации. Также данной компанией в короткий срок были проведены клинические испытания вакцинного препарата от коронавируса [Ward *et al.*, 2021]. На данный момент данная компания является единственной в мире, организовавшей производство вакцин в растительной системе экспрессии.

### Vaccines

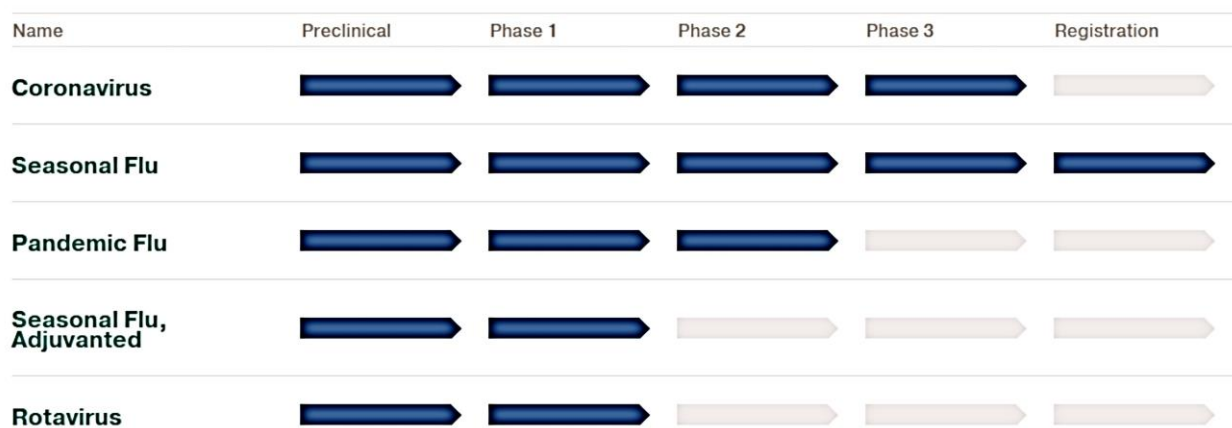


Рисунок 5.1.6. «Растительные» вакцины, разрабатываемые компании Medicago.

### 5.2. Векторы на основе генома *X* картофеля.

Основной и наиболее частой проблемой при экспрессии белков в растениях является низкий выход рекомбинантного белка и обусловленная им высокая стоимость очистки. Разработано большое число вирусных систем экспрессии, из числа наиболее удобных и широко используемых можно

выделить систему рЕАQ-НТ, основанную на элементах генома вируса мозаики коровьего гороха [Sainsbury *et al.*, 2009].

В нашей работе была разработана серия вирусных векторов на основе генома Х вируса картофеля. Наибольшие возможности для экспрессии предоставляет универсальный вектор рUeff, который обладает рядом преимуществ: (1) высокий уровень экспрессии за счет репликации вектора в клетках растения, наличия трансляционного энхансера и кассеты экспрессии гена супрессора посттранскрипционного ген-сайленсинга Р24, (2) простота клонирования целевого гена, (3) возможность направления белка в эндоплазматический ретикулум (рис. 5.2).

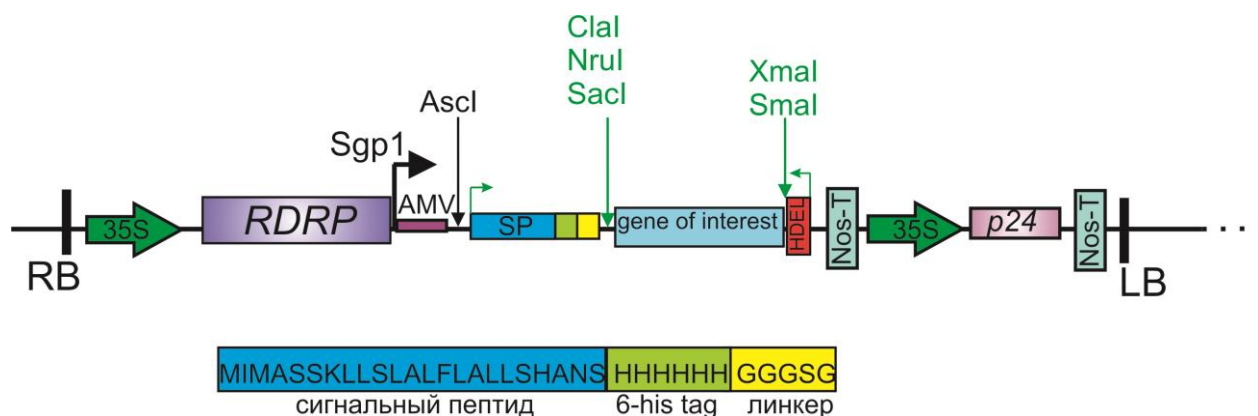


Рисунок 5.1. Схема вектора рUeff. Показана область Т-ДНК рекомбинантного бинарного вектора: RDRP – РНК зависимая РНК полимеразы ХВК; Sgp1 – первый субгеномный промотор ХВК. 35S – промотор РНК вируса мозаики цветной капусты, Nos-T –терминатор, р24 – ген супрессора сайленсинга, SP – сигнальный пептид. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

Преимущество созданного нами вектора на основе генома ХВК по сравнению с одним из самых популярных векторов для экспрессии гетерологичных генов в растениях, рЕАQ, было показано при экспрессии нескольких рекомбинантных белков: флагеллина с М2е пептидом, капсидного белка вируса гепатита Е с М2е пептидом и без него. Уровни экспрессии этих белков при использовании наших векторов были в 3 – 4 раза, чем при использовании системы рЕАQ.

В 2021г были опубликованы результаты сравнительного исследования эффективности нашей системы экспрессии и векторной системы рEAQ при получении в растениях спиральных вирусоподобных частиц, образуемых капсидными белками двух потексвирусов, вируса мозаики папайи и вируса мозаики альтернантеры [Thuenemann *et al.*, 2021]. Получение спиральных вирусоподобных частиц в растениях вызывает проблемы, поскольку для их сборки *in vivo* требуется «каркасная» молекула РНК. В работе было показано, что использование для экспрессии самореплицирующегося вектора рEff позволяет получить значительно большее количество частиц, причем криоэлектронная микроскопия показала сходство их структуры с нативными частицами потексвирусов. Таким образом, векторы рEff, образующие реплицирующиеся молекулы РНК в клетках растений, могут быть использованы для получения спиральных вирусоподобных частиц.

### 5.3. Экспрессия в растениях консервативных антигенов вируса гриппа А для разработки «универсальных» противогриппозных вакцин.

Разработанные нами экспрессионные системы были использованы для получения в растениях различных рекомбинантных белков, но основной задачей была разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе консервативных антигенов. Первым выбранным антигеном был внеклеточный домен мембранного белка М2 (М2е пептид), который может быть основой «универсальной» вакцины.

Мы создали вирусную систему экспрессии в растениях НВс антигена с присоединенным к нему М2е пептидом (одна копия на N-конце). С помощью вирусного вектора на основе генома вируса Х картофеля белок М2еНВс был экспрессирован в листьях *N. benthamiana* на уровне 1–2% общего растворимого белка при использовании вектора рA7248AMV и 5–10% при использовании вектора рEff, причем синтезированный гибридный белок собирался в вирусоподобные частицы. Иммунизация мышей М2еНВс частицами вызывает эффективный иммунный ответ против М2е и

обеспечивает формирование протективного иммунитета против летальной гриппозной инфекции, хотя защита была неполной (90% выживаемость при заражении дозой 1 x LD50). Вероятно, недостаточная эффективность этого препарата связана с двумя факторами. Во-первых, N-концевые включения хотя и обеспечивают экспонирование пептида на поверхности частицы, но наибольшей иммуногенностью обладают включения в район «иммунодоминантной» петли (75-85 aa) [Pumpens et al., 2001]. В этом случае иммунный ответ в основном направляется на встроенный эпитоп, а не носитель [Tsybalova et al., 2015]. Во-вторых, иммунный ответ может быть усилен за счет включения нескольких копий M2e пептида [Ravin et al., 2015], причем для полученных в *E. coli* M2eHВс частиц наблюдалась корреляция между числом копий M2e и иммуногенностью, 100% защиту обеспечивали частицы с 4 копиями M2e [Ravin et al., 2015]. Однако аналогичный белок (HВс с M2e пептидом, включенным в иммунодоминантную петлю) хотя и экспрессировался в растениях, но был нерастворимым, что не позволяло получить вирусоподобные частицы.

Поэтому на следующем этапе работы в качестве адъюванта-носителя мы использовали флагеллин *Salmonella typhimurium* и присоединили к нему четыре тандемные копии M2e пептида. В этом случае адъювантное действие не зависит от образования частиц, а носитель намного более «толерантен» к вставкам. Для создания кандидатной вакцины мы присоединили к С-концу флагеллина 4 копии M2e пептида. Использование вирусного вектора на основе генома PVX позволило достичь очень высокого уровня экспрессии белка Flg-4M, – около 1 мг/г ткани листа, что близко к предельным значениям, достигаемым для GFP. Интраназальная иммунизация мышей вакцинным белком индуцировала высокие уровни специфичных к M2e антител в сыворотках и выделениях слизистых, обеспечивала защиту от заражения вируса гриппа человека A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 5 x LD50. Эти результаты показывают, что экспрессия белков на основе флагеллина и M2e в растениях возможна на высоком уровне, что может стать перспективным

подходом для получения “универсальных” рекомбинантных вакцин против гриппа.

Хотя вакцины на основе M2 могут защищать от инфекции, антитела против M2 не являются вирус-нейтрализующими, и эти вакцины уступают по эффективности традиционным препаратам, основанным на гемагглютинине и нейраминидазе. Поэтому на следующем этапе работы мы присоединили к флагеллину не только M2e пептид, но и консервативный фрагмент второй субъединицы гемагглютинина (HA2). Включение обоих антигенов в вакцинный препарат может обеспечить более разнообразный спектр антител после иммунизации и, таким образом, повысить ее эффективность [Cañizares *et al.*, 2005; Chichester *et al.*, 2007]. Мы использовали четыре тандемные копии M2e — две копии “консенсусного” пептида M2e вирусов гриппа А человека и две копии пептида M2e пандемического штамма A/H1N1pdm09. Эти последовательности различаются в четырех из 23 аа, но эти различия важны для специфичности иммунного ответа [D’Aoust *et al.*, 2010].

HA является основным антигеном вируса гриппа. В отличие от M2e, он индуцирует образование вирус-нейтрализующих антител при иммунизации. Высокая изменчивость HA отвечает за антигенную изменчивость вируса гриппа, но вторая субъединица (HA2) более консервативна [Mett *et al.*, 2008]. Несколько вакцин-кандидатов, включающих “консенсусные” фрагменты HA2 первой и второй филогенетических групп вируса, были описаны в последние годы [Shoji *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2006]. В данном исследовании мы использовали высококонсервативную область от 76 до 130 аа HA2, которая может обеспечивать защитные свойства [Feng *et al.*, 2006]. Поскольку пептиды HA2 расположены во “внутренней” части HA, данный фрагмент был включен в гибридный белок между флагеллином и 4 тандемными копиями M2e. Однако иммунизация Flg4M2eHA2-1 индуцировала сравнительно низкий уровень антител против HA2 по сравнению с M2e. Аналогичный результат с сильным иммунным ответом на M2e и слабым ответом на HA2 был получен и для кандидатной вакцины на

M2e и HA2 из второй филогенетической группы вирусов гриппа, присоединенных к флагеллину [Huleatt *et al.*, 2008].

В этом исследовании мы использовали вектор pEff на основе PVX для экспрессии рекомбинантных белков в клетках растений. При экспрессии гибридного белка Flg-4M, он был растворим и синтезировался на уровне около 1 мг/г ткани листа. В то же время уровень экспрессии Flg4M2eHA2-1 был в несколько раз ниже, а белок был нерастворим. Вероятно, именно включение HA2 в гибридный белок привело к более низкой экспрессии и нерастворимости гибридного белка. Большое количество гидрофобных аминокислотных остатков в HA2-1 (21 из 55 aa), вероятно, объясняет нерастворимость белка Flg4M2eHA2-1.

Тем не менее, интраназальная иммунизация мышей белком Flg4M2eHA2-1 обеспечивала защиту от инфекции. Полная защита наблюдалась при заражении 2 x LD50 A/AICHI/2/68 (H3N2) и 90% защита в случае использования более высокой дозы, 5 x LD50. Поскольку иммунизация белком Flg4M2eHA2-1 индуцировала высокий уровень антител IgG, распознающих оба типа M2e, можно ожидать, что этот белок будет обеспечивать защиту как от типичных штаммов человеческого гриппа, так и от штамма A/H1N1pdm09.

#### 5.4. Капсидный белок вируса гепатита E как носитель антигенов.

Капсидный белок вируса гепатита E был использован в двух целях: (i) для разработки кандидатной вакцины против гепатита E и (ii) в качестве носителя M2e пептида вируса гриппа A и RBD фрагмента белка S коронавируса SARS-CoV-2.

В качестве основы для получения вирусоподобных частиц был использован укороченный вариант капсидного белка, с 110 по 610 aa. Как «пустой» капсидный белок, так и гибридные капсидные белки с присоединенными M2e пептидами эффективно синтезировались в *N. benthamiana* на уровне ~ 300 µg с 1 g. Белки являлись растворимыми, они

выделяются с помощью металл-аффинной хроматографии с выходом 150 – 200  $\mu\text{g}$  с 1 г. Все белки формировали вирусоподобные частицы *in vivo*. Иммунизация мышей данными препаратами приводит к выработке специфических IgG антител к HEV на высоком уровне. Иммунизация препаратами, содержащими M2e пептид вируса гриппа А, приводила к образованию IgG антител к M2e, однако титры антител были невысокими. Вероятно, как и в случае M2e-НВс частиц, это связано с использованием одной копии M2e. Улучшение иммуногенных свойств рекомбинантных белков может быть достигнуто за счет использования нескольких копий M2e пептида.

На основе капсидного белка HEV, экспрессированного в растениях *N. benthamiana* с помощью pEff вектора, нашими коллегами (Dr. Gergana Zahmanova, Болгария) была разработана методика диагностики заболевания свиней вирусом гепатита E [Takova et al., 2021].

Более низкие уровни экспрессии (80–100  $\mu\text{g}$  с 1 г листа), были достигнуты при экспрессии рекомбинантного белка HEV/RBD, содержащего RBD фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2. Белок был растворим частично, а выход после очистки составлял  $\sim 20$   $\mu\text{g}$  с 1 г биомассы листа. Гибридный белок образовывал вирусоподобные частицы размером 30-50 нм. Мы показали, что антитела, вырабатываемые у пациентов с COVID-19, могут связываться с HEV/RBD частицами, что указывает на расположение RBD на поверхности частицы. Таким образом, рекомбинантный белок HEV/RBD может стать основой для разработки диагностикомов для COVID-19, а возможно и вакцин.

Полученные результаты показывают, что капсидный белок HEV является перспективной «платформой» для создания кандидатных вакцин на основе вирусоподобных частиц. С помощью вирусного вектора этот белок экспрессируется в растениях на высоком уровне (около 30% от максимально возможного), является растворимым и образует *in vivo* вирусоподобные частицы. Идентифицированы места включения эпитопов, не нарушающие



сборку частиц, для выделения которых могут быть использованы методы металл-аффинной хроматографии.

### 5.5. Экспрессия в растениях антигенов коронавируса SARS-CoV-2.

Гликопротеин S и его укороченные варианты считаются кандидатами на создание рекомбинантных вакцин против SARS-CoV-2 и диагностикумов.

В данной работе нами были использованы три варианта антигенов: полноразмерный белок S1 (начиная с 15 aa), рецептор-связывающий домен RBD (319-541 aa) и укороченный вариант RBD (319-524 aa).

При экспрессии полноразмерного S1 белка и RBD (319-541 aa, и 319-524 aa, штамм Wuhan-Hu-1) на вторые сутки после инфильтрации в зонах агроинфильтрации начинали появляться признаки некроза для всех векторов. SDS-PAGE и вестерн блоттинг не выявили целевые белки в листьях растений-продуцентов, как в растворимой фракции, так и в суммарном белковом препарате. Однако препарат RBD (319-524 aa) удалось выделить из растений-продуцентов и очистить с помощью металл-аффинной хроматографии с выходом ~ 15 мкг/г.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая RBD (319-541 aa) штамма Delta, была адаптирована по кодоновому составу для *N. benthamiana*. Эффективность экспрессии RBD\_319-541 штамма Delta составила 50–60 мкг на 1 грамм листьев, а выход очищенного белка составлял 20 мкг на 1 грамм листьев.

Эти результаты согласуются с результатами других работ. В одном исследовании RBD был получен с выходом до 8 мкг/г [Rattanapisit *et al.*, 2020] при выделении с помощью металл-аффинной хроматографии, а в другой работе выход после очистки RBD-His белка был менее 10 мкг/кг биомассы листа, а RBD с FLAG тагом - около 20 мкг/кг биомассы листа [Mamedov *et al.*, 2020].

Для повышения уровня экспрессии и иммуногенности RBD мы использовали стратегию его присоединения к адьюванту-носителю. Имея

положительный опыт при экспрессии антигенов вируса гриппа, присоединенных к флагеллину, данный подход мы применили и для экспрессии RBD. Гибридный белок Flg-RBD экспрессировался в растениях на уровне 110 – 120 мг/кг биомассы листа, и выделялся с помощью металл-аффинной хроматографии с эффективностью 90 – 100 мг/кг. Этот рекомбинантный белок препарат может быть использован для разработки профилактической вакцины от коронавируса.

*5.6. Экспрессия в растениях кандидатных вакцин с помощью векторов на основе генома X вируса картофеля, разработанных в данной работе.*

Мы создали серию экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля. По мере разработки векторов в растениях экспрессировали вакцинные белки возбудителей нескольких социально-значимых инфекций. В таблице 5.6.1 представлены экспрессируемые антигены и используемые векторы. Разработанные методики получения в растениях-биофабриках кандидатных вакцин могут быть применены для масштабного производства.

Таблица 5.6.1. Основные характеристики растительных систем экспрессии

Белок	Вектор	Уровень экспрессии	Выход после очистки	Образование VLP	Иммунногенность	Протективное действие (% защиты, инфекционная доза, вирус)
Грипп						
M2ерHbc	pA7248 AMV	1-2% от растворимой фракции	NR	~ 30 nm	+	90%, 1 LD <sub>50</sub> A/Chicken/Kurgan/05/2005
M2ерHbc	pEff	5-10% от растворимой фракции	NR	~ 30 nm	NR	NR
Flg-4M	pA7248 AMV	до ≤ 30% от растворимой фракции, ~ 1000 мкг/г	350-400 мкг/г	NA	+	75%, 5 LD <sub>50</sub> A/Kurgan/5/05 H5N1, 50%, 10 LD <sub>50</sub> A/PR/8/34 H1N1, 100%, 5 LD <sub>50</sub> 0 A/PR/8/34 H1N1,
Flg4M2e HA2-1	pEff	300 мкг/г	60 мкг/г	NA	+	100%, 2 LD <sub>50</sub> A/Aichi/2/68, 90%, 5 LD <sub>50</sub> A/Aichi/2/68
M2 HEV 110-610	pEff	300 мкг/г	150-200 мкг/г	~ 30 nm	+	NR
Гепатит E						
HEV 110-610	pEff	300 мкг/г	150-200 мкг/г	~ 20 nm	+	NR
COVID-19						
RBD 319-524	pEff	NR	~15 мкг/г	NA	NR	NR
HEV/RBD	pAeff	80-100 мкг/г	20 мкг/г	~ 30 nm	NR	NR
Flg-RBD	pEff	110-120 мкг/г	90-100 мкг/г	NA	NR	NR
RBD <sub>delta</sub>	pAeff	50-60 мкг/г	20 мкг/г	NA	NR	NR
Flg-19S-RBD <sub>delta</sub>	pAeff	100-150 мкг/г	60 мкг/г	NA	NR	NR
RBD <sub>delta</sub> -4M2e	pAeff	~ 150 мкг/г	60 мкг/г	NA	NR	NR
Flg-19S-RBD <sub>delta</sub> -4M2e	pAeff	100-150 мкг/г	90 мкг/г	NA	NR	NR

NA, не может образовываться; NR, не определяли

За последние 30 лет были разработаны различные получаемые в растениях-продуцентах кандидатные вакцины медицинского и ветеринарного назначения. Основные проблемы получения вакцин в растениях включали низкий уровень экспрессии антигена, опасения по поводу особенностей гликозилирования в растениях и трудности с выделением и очисткой. Проблема с низкой экспрессией может быть решена за счет использования транзистентной экспрессии и вирусных векторов, а также с помощью оптимизации клеточной локализации и использования белков-носителей. Между тем, гликозилирование растений, по-видимому, не является существенным камнем преткновения для «растительных» вакцин, несмотря на первоначальные опасения. Растительные гликаны, как правило, не снижают специфичность иммунного ответа. Более того, геномное редактирование растений позволяет модифицировать пути гликозилирования, устраняя отсутствующие у млекопитающих модификации [Salazar-González et al., 2015; Margolin *et al.*, 2020].

Трудности с выделением и очисткой в значительной степени остаются препятствием для перехода растительных кандидатных вакцин из лабораторных исследований в клиническую практику [Buyel *et al.*, 2105; Schillberg *et al.*, 2021]. В настоящее время проблемы, связанные с контролем дозировки, а также надлежащей производственной практикой [Fischer *et al.*, 2020], практически «уничтожили» идею съедобных вакцин, которые не требовали бы дорогостоящей и трудоемкой очистки. Напротив, VLP гриппа [Wars et al., 2020] и SARS-CoV-2 [Ward et al., 2021], которые в настоящее время прошли клинические испытания, являются очищенными продуктами, разработанными для инъекций, готовы к массовому производству и применению.

## ВЫВОДЫ

1. Создана серия самореплицирующихся векторов на основе генома X вируса картофеля для транзientной экспрессии рекомбинантных белков в растениях.
2. Включение в состав вектора трансляционного энхансера (лидерной последовательности РНК вируса мозаики люцерны) перед геном целевого белка, а также кассеты экспрессии гена супрессора посттранскрипционного ген-сайленсинга, повышает уровень экспрессии целевого белка.
3. Экспрессированный в растениях ядерный антиген вируса гепатита В с присоединенным M2e пептидом вируса гриппа А образовывал *in vivo* вирусоподобные частицы, а при иммунизации мышей индуцировал эффективный иммунный ответ против M2e и обеспечивал защиту от летальной гриппозной инфекции.
4. Экспрессированный в растениях химерный белок Flg-4M, содержащий флагеллин бактерии *Salmonella typhimurium*, соединенный с четырьмя tandemными копиями M2e пептида вируса гриппа А, при интраназальной иммунизации мышей индуцировал высокие уровни M2e-специфических сывороточных антител и обеспечивал защиту от летальной гриппозной инфекции.
5. Экспрессированный в растениях химерный белок Flg4M2eHA2-1, содержащий флагеллин с присоединенными к нему консервативным фрагментом гемагглютинаина и четырьмя копиями M2e пептида вируса гриппа А, при интраназальной иммунизации мышей индуцировал высокие уровни M2e-специфических сывороточных антител при слабом иммунном ответе в отношении гемагглютинаина, и обеспечивал защиту от летальной гриппозной инфекции.
6. Белки Flg-4M и Flg4M2eHA2-1 могут быть использованы в качестве основы кандидатной «растительной» вакцины от гриппа А, которую можно вводить интраназально.

7. Укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита E, экспрессированный в растениях, образовывал *in vivo* вирусоподобные частицы, обладающие высокой иммуногенностью. Этот белок может быть использован для разработки кандидатных вакцин от вируса гепатита E и диагностикумов.
8. Показана возможность получения в растительной системе экспрессии вирусоподобных частиц, образуемых капсидным белком вируса гепатита E, в который включены M2e пептид вируса гриппа A или RBD фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2.
9. Показана возможность получения в растительной системе экспрессии RBD фрагмента белка S коронавируса SARS-CoV-2, RBD фрагмента слитого с четырьмя копиями M2e пептида вируса гриппа A, а также этих белков, присоединенных к флагеллину бактерии *S. typhimurium*.
10. Белок, включающий флагеллин, RBD и M2e, может быть использован для разработки «растительной» рекомбинантной бивалентной вакцины против гриппа A и COVID-19, с интраназальным способом введения.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Blokhina, E.A., **Mardanova, E.S.**, Zyкова, A.A., Stepanova, L.A., Shuklina, M.A., Tsybalova, L.M., & Ravin, N.V. (2023). Plant-Produced Nanoparticles Based on Artificial Self-Assembling Peptide Bearing the Influenza M2e Epitope. *Plants*, 12(11), 2228. Доля участия = 50%. 0.8 п. л.
2. **Mardanova, E.S.**, Kotlyarov, R.Y., Stuchinskaya, M.D., Nikolaeva, L.I., Zahmanova, G., & Ravin, N.V. (2022). High-Yield Production of Chimeric Hepatitis E Virus-Like Particles Bearing the M2e Influenza Epitope and Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 in Plants Using Viral Vectors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15684. Доля участия = 70%. 1.4 п. л.
3. **Mardanova, E.S.**, Kotlyarov, R.Y., & Ravin, N.V. (2022). Rapid Transient Expression of Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2 and the Conserved M2e Peptide of Influenza A Virus Linked to Flagellin in *Nicotiana benthamiana* Plants Using Self-Replicating Viral Vector. *Plants*, 11(24), 3425. Доля участия = 70%. 0.9 п. л.
4. **Mardanova, E.S.**, Kotlyarov, R.Y., & Ravin, N.V. (2021). High-yield production of receptor binding domain of SARS-CoV-2 linked to bacterial flagellin in plants using self-replicating viral vector pEff. *Plants*, 10(12), 2682. Доля участия = 80%. 1.0 п. л.
5. Takova, K., Koynarski, T., Minkov, G., Toneva, V., **Mardanova, E.**, Ravin, N., Lukov, G. L., & Zahmanova, G. (2021). Development and optimization of an enzyme immunoassay to detect serum antibodies against the hepatitis E virus in pigs, using plant-derived ORF2 recombinant protein. *Vaccines*, 9(9), 991. Доля участия = 30%. 0.5 п. л.

6. **Mardanovа, E.S.**, & Ravin, N.V. (2021). Transient expression of recombinant proteins in plants using potato virus X based vectors. *Methods in Enzymology* 660, 205-222. Доля участия = 90%. 1.8 п. л.
7. **Mardanovа, E.S.**, Takova, K.H., Toneva, V.T., Zahmanova, G.G., Tsybalova, L.M., & Ravin, N.V. (2020). A plant-based transient expression system for the rapid production of highly immunogenic Hepatitis E virus-like particles. *Biotechnology Letters*, 42(11), 2441-2446. Доля участия = 70%. 0.5 п. л.
8. Blokhina, E.A., **Mardanovа, E.S.**, Stepanova, L.A., Tsybalova, L.M., & Ravin, N.V. (2020). Plant-produced recombinant Influenza A virus candidate vaccine based on flagellin linked to conservative fragments of M2 protein and hemagglutinin. *Plants*, 9(2), 162. Доля участия = 50%. 0.7 п. л.
9. Zahmanova, G.G., Mazalovska, M., Takova, K.H., Toneva, V.T., Minkov, I.N., **Mardanovа, E.S.**, Ravin N.V., & Lomonosoff, G.P. (2019). Rapid high-yield transient expression of swine hepatitis E ORF2 capsid proteins in *Nicotiana benthamiana* plants and production of chimeric hepatitis E virus-like particles bearing the M2e influenza epitope. *Plants*, 9(1), 29. Доля участия = 30%. 0.6 п. л.
10. Tsybalova, L.M., Stepanova, L.A., Shuklina, M.A., **Mardanovа, E.S.**, Kotlyarov, R.Y., Potapchuk, M.V., Petrov, S.A., Blokhina, E.A., & Ravin, N.V. (2018). Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine. *PLoS One*, 13(8), e0201429. Доля участия = 30%. 0.7 п. л.



11. Блохина Е.А., **Марданова Е.С.**, Цыбалова Л.М., Равин Н.В. (2018) Экспрессия в растениях рекомбинантного белка на основе флагеллина, содержащего консервативные участки М2 белка и гемагглютинина вируса гриппа. *Прикладная биохимия и микробиология*. т. 54, № 4, с. 385–390. Доля участия = 50%. 0.3 п. л.
12. **Mardanovа, E.S.**, & Ravin, N.V. (2018). Plant-produced recombinant influenza A vaccines based on the M2e peptide. *Current Pharmaceutical Design*, 24(12), 1317-1324. Доля участия = 90%. 0.8 п. л.
13. Stepanova, L.A., **Mardanovа, E.S.**, Shuklina, M.A., Blokhina, E.A., Kotlyarov, R.Y., Potapchuk, M.V., Kovaleva, A.A., Vidyayeva, I.G., Korotkov, A.V., Eletskaaya, E.I., Ravin, N.V., & Tsybalova, L.M. (2018). Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 1-15. Доля участия = 40%. 0.7 п. л.
14. Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Котляров Р.Ю., Блохина Е.А., Шуклина М.А., **Марданова Е.С.**, Коротков А.В., Потапчук М.В., Равин Н.В. (2017) Усиление эффективности кандидатной вакцины против гриппа сочетанием консервативных последовательностей гемагглютинина и М2 белка. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, № 3 (94), с. 65-70. Доля участия = 30%. 0.3 п. л.
15. **Mardanovа, E.S.**, Blokhina, E.A., Tsybalova, L.M., Peyret, H., Lomonosoff, G.P., & Ravin, N.V. (2017). Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of potato virus X. *Frontiers in Plant Science*, 8, 247. Доля участия = 80%. 0.8 п. л.

16. **Mardanov, E.S.**, Kotlyarov, R.Y., Kuprianov, V.V., Stepanova, L.A., Tsybalova, L.M., Lomonosoff, G.P., & Ravin, N.V. (2016). High immunogenicity of plant-produced candidate influenza vaccine based on the M2e peptide fused to flagellin. *Bioengineered*, 7(1), 28-32. Доля участия = 60%. 0.8 п. л.
17. **Mardanov, E.S.**, Kotlyarov, R.Y., Kuprianov, V.V., Stepanova, L.A., Tsybalova, L.M., Lomonosoff, G.P., & Ravin, N.V. (2015). Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors. *BMC Biotechnology*, 15, 42. Доля участия = 70%. 0.9 п. л.
18. Равин Н.В., Котляров Р.Ю., **Марданова Е.С.**, Куприянов В.В., А.И. Мигунов, Л.А. Степанова, Л.М. Цыбалова, Киселев О.И., Скрыбин К.Г. (2012) Продукция в растениях рекомбинантной противогриппозной вакцины на основе вирусоподобных НВс-частиц, несущих внеклеточный домен М2 белка. *Биохимия*, т.77, №1, с. 43-52. Доля участия = 30%. 0.3 п. л.
19. **Марданова, Е.С.**, Котляров, Р.Ю., & Равин, Н.В. (2009). Повышение эффективности продукции рекомбинантных белков в растениях за счет оптимизации трансляции РНК вируса-вектора. *Молекулярная биология*, 43(3), 568-571. Доля участия = 90%. 0.4 п. л.

## ПАТЕНТЫ

1. **Марданова Е.С.,** Равин Н.В. (2010) Вирусный вектор для продукции рекомбинантных белков в растениях. Патент РФ № 2402607 от 27.10.2010г.
2. **Марданова Е.С.,** Котляров Р.Ю., Куприянов В.В., Равин Н.В., Скрыбин К.Г. (2012) Рекомбинантный вирусный вектор и система экспрессии в клетках растения гибридного белка, включающего внеклеточный домен белка М2 вируса гриппа, присоединенный к ядерному антигену вируса гепатита В. Патент РФ № 2460796 от 10.09.2012г.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abravanel, F.; Lhomme, S.; El Costa, H.; Schwartz, B.; Peron, J.-M.; Kamar, N.; Izopet, J. Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France. *Emerg Infect Dis.* 2017, 23, 1191–1193,
2. Acheson, N.H. Fundamentals of molecular virology. *John Wiley & Sons.* 2nd edition. 2011, P. 214.
3. Ahlquist, P.; French, R.; Janda, M.; Loesch Fries, S. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Nov;81(22):7066-70.
4. Alexandar, S., Ravisankar, M., Kumar, R. S., & Jakkan, K. (2021). A comprehensive review on Covid-19 Delta variant. *International Journal of Pharmacology and Clinical Research (IJPCR)*, 5(83-85), 7.
5. Ameghi, A.; Pilehvar-Soltanahmadi, Y.; Baradaran, B.; Barzegar, A.; Taghizadeh, M.; Zarghami, N.; Aghaiypour, K. Protective immunity against homologous and heterologous influenza virus lethal challenge by immunization with new recombinant chimeric HA2-M2e fusion protein in balb/c mice. *Viral. Immunol.* 2016, 29, 228–234.
6. Antonopoulos, A., Broome, S., Sharov, V., Ziegenfuss, C., Easton, R. L., Panico, M., ... & Haslam, S. M. (2021). Site-specific characterization of SARS-CoV-2 spike glycoprotein receptor-binding domain. *Glycobiology*, 31(3), 181–187.
7. Arazi, T.; Lee Huang, P.; Huang, P. L.; Zhang, L.; Moshe Shibolet, Y.; Gal-On, A.; Lee-Huang, S. Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 292, 441–448.
8. Avdjieva, I.; Terziyski, I.; Zahmanova, G.; Simeonova, V.; Kulev, O.; Krustev, E.; Krachunov, M.; Nisheva, M.; Vassilev, D. Homology based computational modelling of hepatitis-E viral fusion capsid protein. *C. R. De l'Academie Bulgare Des. Sci.* 2019, 72, 358–364.

9. Avesani, L.; Marconi, G.; Morandini, F. et al. Stability of potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res.* 2007, 16, 587–597.
10. Bachmann, M. F.; Jennings, G. T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10, 787–796.
11. Balayan, M. S.; Andjaparidze, A. G.; Savinskaya, S. S.; Ketiladze, E. S.; Braginsky, D. M.; Savinov, A. P. & Poleschuk, V. F. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983, 20 (1), 23–31.
12. Barta, A.; Sommergruber, K.; Thompson, D.; Hartmuth, K.; Matzke, M. A.; Matzke, A. J. M. The expression of a nopalinesynthase—Human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* 1986, 6, 347–357.
13. Baulcombe, D. C.; Chapman, S.; Santa Cruz, S. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 1995, 7, 1045–1053.
14. Bevan, M. *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 8711–8721.
15. Blokhina, E.A.; Mardanova, E.S.; Stepanova, L.A.; Tsybalova, L.M.; Ravin, N.V. Plant-Produced Recombinant Influenza A Virus Candidate Vaccine Based on Flagellin Linked to Conservative Fragments of M2 Protein and Hemagglutinin. *Plants* 2020, 9, 162.
16. Böttcher, B.; Tsuji, N.; Takahashi, H.; Dyson, M. R.; Zhao, S.; Crowther, R. A.; and Murray, K. Peptides that block hepatitis B virus assembly: Analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *EMBO J.* 1998. 17, 6839–6845.
17. Boulo, S.; Akarsu, H.; Ruigrok, R.W.; Baudin, F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* 2007, 124 (1), 12–21.

18. Bouton, C.; King, R. C.; Chen, H.; Azhakanandam, K.; Bieri, S.; Hammond-Kosack, K. E.; Kanyuka, K. Foxtail mosaic virus: A Viral Vector for Protein Expression in Cereals. *Plant Physiol.* 2018, 177, 1352–1367.
19. Bradley, D.; Andjaparidze, A.; Cook, E.H.; McCaustland, K.; Balayan, M.; Stetler, H.; Velazquez, O.; Robertson, B.; Humphrey, C.; Kane, M. Aetiological agent of enterically transmitted non-A., non-B hepatitis. *J. Gen. Virol.* 1988, 69, 731–738.
20. Buyel, J. F.; Twyman, R. M.; Fischer, R. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33 Pt 1, 902–913.
21. Cañizares, M. C.; Nicholson, L.; Lomonosoff, G. P. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol.* 2005, 83, 263–70.
22. Cao, Y. F.; Tao, H.; Hu, Y.M.; Shi, C. B.; Wu, X.; Liang, Q.; Chi, C. P.; Li, L.; Liang, Z. L.; Meng, J. H.; Zhu, F. C.; Liu, Z. H.; Wang, X. P. A phase 1 randomized open-label clinical study to evaluate the safety and tolerability of a novel recombinant Hepatitis E vaccine. *Vaccine* 2017, 35, 5073–5080.
23. Capell, T.; Twyman, R. M.; Armario-Najera, V.; Ma, J. K.; Schillberg, S.; Christou, P. Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends Plant Sci.* 2020, 25, 635–643.
24. Carignan, D.; Thérien, A.; Rioux, G., et al. Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. *Vaccine* 2015, 33(51), 7245-53.
25. Ceballo, Y.; Tiel, K.; López, A.; Cabrera, G.; Pérez, M.; Ramos, O.; Rosabal, Y.; Montero, C.; Menassa, R.; Depicker, A.; et al. High accumulation in tobacco seeds of hemagglutinin antigen from avian (H5N1) influenza. *Transgenic Res.* 2017, 26, 775–789.
26. Cellar, N. A., Kuppannan, K., Langhorst, M. L., Ni, W., Xu, P., & Young, S. A. (2008). Cross species applicability of abundant protein depletion columns for ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Chromatography B*, 861(1), 29-39.

27. Chiba, M.; Reed, J. C.; Prokhnovsky, A. I.; Chapman, E. J.; Mawassi, M.; Koonin, E. V., et al. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 2006, 346, 7–14.
28. Chicas, A., & Macino, G. (2001). Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO reports*, 2(11), 992-996.
29. Chichester, J. A.; Jones, R. M.; Green, B. J.; Stow, M.; Miao, F.; Moonsammy, G.; Streatfield, S. J.; Yusibov, V. Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant hemagglutinin-based influenza vaccine (HAI-05) derived from A/Indonesia/05/2005 (H5N1) influenza virus: A phase 1 randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy adults. *Viruses* 2012, 4, 3227–3244.
30. Chichester, J. A.; Yusibov, V. Plants as alternative systems for production of vaccines. *Hum Vaccines* 2007, 3, 146–9.
31. Chung, H. Y.; Lee, H. H.; Kim, K. I.; Chung, H. Y.; Hwang-Bo, J.; Park, J. H.; Sunter, G.; Kim, J. B.; Shon, D. H.; Kim, W.; et al. Expression of a recombinant chimeric protein of hepatitis A virus VP1-Fc using a replicating vector based on Beet curly top virus in tobacco leaves and its immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep.* 2011, 30, 1513–1521.
32. Coleman, C M; Liu, Ye V.; Mu, H.; Taylor, J. K.; Massare, M.; David C Flyer, Smith, G. E.; Frieman, M. B. Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 2014, May 30;32(26):3169-3174.
33. Cros, J. F.; García-Sastre, A.; Palese, P. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the in-fluenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* 2005, 6 (3), 205–213.
34. Cross, K. J.; Langley, W. A.; Russell, R. J.; Skehel, J. J.; Steinhauer, D. A. Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept Lett.* 2009, 16 (7), 766–778.
35. Cummings, J. F.; Guerrero, M. L.; Moon, J. E.; Waterman, P.; Nielsen, R. K.; Jefferson, S.; Gross, F. L.; Hancock, K.; Katz, J. M.; Yusibov, V. Safety

- and immunogenicity of a plant-produced recombinant monomer hemagglutinin-based influenza vaccine derived from influenza A (H1N1)pdm09 virus: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine* 2014, 32, 2251–2259.
- 36.D'Aoust, M. A.; Couture, M. M.; Charland, N. et al. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.* 2010, 8, 607–619.
- 37.D'Aoust, M. A.; Lavoie, P. O.; Couture, M. M.; Trepanier, S.; Guay, J. M.; Dargis, M.; Mongrand, S.; Landry, N.; Ward, B. J.; Vezina, L. P. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol. J.* 2008, 6, 930–940.
- 38.Dai, L., & Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 21(2), 73-82.
- 39.Dawson, W. O. A personal history of virus-based vector construction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014, 375, 1–18.
- 40.De Filette, M.; Fiers, W.; Martens, W.; Birkett, A.; Ramne, A.; Lowenadler, B.; Lycke, N.; Jou, W.M.; Saelens, X. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine* 2006, 24, 6597–6601.
- 41.De Filette, M.; Martens, W.; Roose, K.; Deroo, T.; Vervalle, F.; Bentahir, M.; Vandekerckhove, J.; Fiers, W.; Saelens, X. An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J Biol Chem.* 2008, 283 (17), 11382–11387.
- 42.De Filette, M.; Min Jou, W.; Birkett, A.; Lyons, K.; Schultz, B.; Tonkyro, A.; Resch, S.; Fiers, W. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology* 2005, 337 (1), 149–161.
- 43.Demurtas, O. C.; Massa, S.; Illiano, E.; De Martinis, D.; Chan, P.K.; Di Bonito, P.; Franconi, R. Antigen Production in Plant to Tackle Infectious Diseases Flare Up: The Case of SARS. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 54.



44. Deng, L.; Kim, J.R.; Chang, T.Z.; Zhang, H.; Mohan, T.; Champion, J.A.; Wang, B.Z. Protein nanoparticle vaccine based on flagellin carrier fused to influenza conserved epitopes confers full protection against influenza A virus challenge. *Virology* 2017, 509, 82–89.
45. Denis, J. Acosta-Ramirez, E.; Zhao, Y., et al. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 2008; 26, 3395–403.
46. Dhama, K.; Natesan, S.; Yatoo, M. I.; Patel, S. K.; Tiwari, R.; Saxena, S. K.; Harapan, H. Plant-based vaccines and antibodies to combat COVID-19: current status and prospects. *Hum Vaccin Immunother* 2020, 16(12), 2913–2920.
47. Diego-Martin, B., González, B., Vazquez-Vilar, M., Selma, S., Mateos-Fernández, R., Gianoglio, S., ... & Orzáez, D. (2020). Pilot production of SARS-CoV-2 related proteins in plants: a proof of concept for rapid repurposing of indoor farms into biomanufacturing facilities. *Frontiers in plant science*, 11, 612781.
48. Dolja, V. V.; McBride, H. J.; Carrington, J. C. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 10208–10212.
49. Egelkrout, E.; Hayden, C.; Fake, G.; Keener, T.; Arruda, P.; Saltzman, R.; Walker, J.; Howard, J. Oral delivery of maize-produced porcine epidemic diarrhea virus spike protein elicits neutralizing antibodies in pigs. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2020, 1–8.
50. Ekiert, D. C.; Friesen, R. H.; Bhabha, G.; Kwaks, T.; Jongeneelen, M.; Yu, W.; Ophorst, C.; Cox, F.; Korse, H. J.; Brandenburg, B.; et al. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 2011, 333, 843–850.
51. Emerson, S. U.; Clemente-Casares, P.; Moiduddin, N.; Arankalle, V. A.; Torian, U.; Purcell, R. H. Putative neutralization epitopes and broad cross-

- genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 697–704.
52. Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V., & Michaud, D. (2005). Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine*, 23(15), 1770–1778.
53. Feng, J.; Zhang, M.; Mozdzanowska, K.; Zharikova, D.; Hoff, H.; Wunner, W., et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virol J.* 2006, 3, 102.
54. Fiers, W.; De Filette, M.; Birkett, A.; Neiryneck, S.; Min Jou, W. A “universal” human influenza A vaccine. *Elsevier. Virus Research* 2004, 103, 173–176.
55. Fiers, W.; De Filette, M.; El Bakkouri, K.; Schepens, B.; Roose, K.; Schotsaert, M.; Birkett, A.; Saelens, X. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 2009, 27, 6280–6283.
56. Firsov, A.; Tarasenko, I.; Mitiouchkina, T.; et al. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants. *Mol Biotechnol* 2015, 57(7), 653–61.
57. Fischer, R.; Buyel, J. F. Molecular farming—The slope of enlightenment. *Biotechnol. Adv.* 2020, 40, 107519.
58. Fischer, R.; Schilberg, S.; Helliwig, S., et al. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceuticals proteins. *Biotechnology Advances* 2012, 30, 434–439.
59. Fouchier, R. A. M.; Munster, V.; Wallensten, A.; Bestebroer, T. M.; Herfst, S.; Smith, D.; Rimmelzwaan, G. F.; Olsen, B.; Osterhaus, A. D. M. E.. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 2005, 79 (5), 2814–22.
60. French, R.; Janda, M.; Ahlquist, P. Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: Efficient expression in monocotyledonous plant cells. *Science* 1986, 231, 1294–1297.

61. Ge, S.; Zhang, J.; Huang, G.; Pang, S.; Zhou, K.; Xia, N. The immunoprotect study of a hepatitis E virus ORF2 peptide expressed in *E. coli*. *Weisheng Wu Xue Bao* 2003, 43, 35–42.
62. Gerhard, W.; Mozdzanowska, K.; Zharikova, D. Prospects for universal influenza virus vaccine. *Emerg Infect Dis.* 2006, 12 (4), 569–574.
63. Ghedin, E.; Sengamalay, N. A.; Shumway, M.; Zaborsky, J.; Feldblyum, T.; Subbu, V.; Spiro, D. J.; Sitz, J.; Koo, H.; Bolotov, P.; Dernovoy, D.; Tatusova, T.; Bao, Y.; St George, K.; Taylor, J.; Lipman, D. J.; Fraser, C. M.; Taubenberger, J. K.; Salzberg, S. L. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 2005, 437(7062), 1162–6.
64. Gilbert, G. L. Infections in pregnant women. *MJA* 2002, 176, 229–236.
65. Giritch, A.; Marillonnet, S.; Engler, C., et al. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006, 103, 14701–14706.
66. Gleba, Y.; Klimyuk, V.; Marillonnet, S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 2007, 18, 134–41.
67. Gobeil, P., Pillet, S., Boulay, I., Séguin, A., Makarkov, A., Heizer, G., ... & Ward, B. J. (2021). Interim report of a phase 2 randomized trial of a plant-produced virus-like particle vaccine for Covid-19 in healthy adults aged 18–64 and older adults aged 65 and older.
68. Golebiewski, L.; Liu, H.; Javier, R. T.; Rice, A. P. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *Journal of Virology.* 2011, 20 (85), 10639–10648.
69. Gómez, N.; Carrillo, C.; Salinas, J.; Parra, F.; Borca, M. V.; Escribano, J. M. Expression of Immunogenic Glycoprotein S Polypeptides from Transmissible Gastroenteritis Coronavirus in Transgenic Plants. *Virology* 1998, 249, 352–358.
70. Gómez, N.; Wigdorovitz, A.; Castañón, S.; Gil, F.; Ordás, R.; Borca, M. V.; Escribano, J. M. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein

- from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch. Virol.* 2000, 145, 1725–1732.
71. Gomord, V.; Denmat, L. A.; Fitchette, A. C.; Satiat-Jeunemaitre, B.; Hawes, C.; Faye, L. The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J.* 1997, 11, 313–25.
72. Gong, J.; Xu, W.; Zhang, J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem.* 2007. V. 14. № 1. P. 113–122.
73. Gonzalez, M. E.; Carrasco, L. Viroporins. *FEBS letters* 2003, 1 (552), 28–34.
74. Goodin, M. M.; Zaitlin, D.; Naidu, R. A.; Lommel, S. A. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plantpathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008, 21, 1015–1026.
75. Grant, O. C.; Montgomery, D.; Ito, K.; Woods, R. J.; 2020. 3D Models of glycosylated SARS-CoV-2 spike protein suggest challenges and opportunities for vaccine development. *bioRxiv.* doi: 10.1101/2020.04.07.030445.
76. Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R. and Hanahan, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1990, 87, 4645–4649.
77. Guan, Z.; Liu, D.; Mi, S.; Zhang, J.; Ye, Q.; Wang, M.; Gao, G. F.; Yan, J. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: implications for PKR signaling pathway. *Protein & Cell* 2010, 10 (1), 944–955.
78. Gupta, J.; Kaul, S.; Srivastava, A.; Kaushik, N.; Ghosh, S.; Sharma, C.; Batra, G.; Banerjee, M.; Shalimar; Nayak, B.; et al. Expression, Purification and Characterization of the Hepatitis E Virus Like-Particles in the Pichia Pastoris. *Frontiers in Microbiology* 2020, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00141.
79. Guu, T. S. Y.; Liu, Z.; Ye, Q.; Mata, D. A.; Li, K.; Yin, C.; Zhang, J.; Tao, Y. J. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for

- virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 12992–12997.
- 80.Hager, K. J., Pérez Marc, G., Gobeil, P., Diaz, R. S., Heizer, G., Llapur, C., ... & Ward, B. J. (2022). Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted Covid-19 vaccine. *New England Journal of Medicine*, 386(22), 2084-2096.
- 81.He, X.; Liu, S.; Perry, K. Identification of epitopes in cucumber mosaic virus using a phage-displayed random peptide library. *J Gen Virol* 1998, 79, 3145–53.
- 82.Heermann, K. H.; Goldmann, U.; Schwartz, W.; Seyffarth, T.; Baumgarten, H. and Gerlich, W. H. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the Pre-S sequence. *J. Virol.* 1984, 52, 396–402.
- 83.Hefferon, K. L. DNA Virus Vectors for Vaccine Production in Plants: Spotlight on Geminiviruses. *Vaccines* 2014, 2, 642–653.
- 84.Hefferon, K. Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health. *Biomedicines* 2017, 5, 44.
- 85.Ho, J.K.-T.; Jeevan-Raj, B.; Netter, H.-J. Hepatitis B Virus (HBV) Subviral Particles as Protective Vaccines and Vaccine Platforms. *Viruses* 2020, 12, 126.
- 86.Ho, T. T.; Nguyen, G. T.; Pham, N. B.; Le, V. P.; Trinh, T. B. N.; Vu, T. H.; Phan, H. T.; Conrad, U.; Chu, H. H. Plant-Derived Trimeric CO-26K-Equivalent Epitope Induced Neutralizing Antibodies Against Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Front. Immunol.* 2020, 11, 2152.
- 87.Hobman, T. C.; Lundstrom, M. L.; Mauracher, C. A.; Woodward, L.; Gillam, S., Farquhar, M. G. Assembly of rubella virus structural proteins into virus-like particles in transfected cells. *Virology* 1994, 202(2), 574–85.
- 88.Hood, E. E. From green plants to industrial enzymes. *Enzym. Microb. Technol.* 2002, 30, 279–283.

- 89.Huang, Z.; Santi, L.; LePore, K.; Kilbourne, J.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S. Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 2006, 24, 2506–2513.
- 90.Huber, V.C.; Lynch, J. M.; Bucher, D. J.; Le, J.; Metzger, D. W. Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. *Journal of Immunology* 2001, 166 (12), 7381–7388.
- 91.Huleatt, J. W.; Jacobs, A. R.; Tang, J.; Desai, P.; Kopp, E. B.; Huang, Y., et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* 2007, 25(4), 763–75.
- 92.Huleatt, J. W.; Nakaar, V.; Desai, P.; Huang, Y.; Hewitt, D.; Jacobs, A.; Tang, J.; McDonald, W.; Song, L.; Evans, R. K.; Umlauf, S.; Tussey, L.; Powell, T. J. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine* 2008, 26, 201–214.
- 93.Huy, N. X.; Kim, S. H.; Yang, M. S.; Kim, T. G. Immunogenicity of a neutralizing epitope from porcine epidemic diarrhea virus: M cell targeting ligand fusion protein expressed in transgenic rice calli. *Plant Cell Rep.* 2012, 31, 1933–1942.
- 94.Huy, N. X.; Kim, Y. S.; Jun, S. C.; Jin, Z.; Park, S. M.; Yang, M. S.; Kim, T. G. Production of a heat-labile enterotoxin B subunit-porcine epidemic diarrhea virus-neutralizing epitope fusion protein in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Biotechnol. Bioprocess Eng. BBE* 2009, 14, 731–737.
- 95.Huy, N. X.; Yang, M. S.; Kim, T. G. Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Mol. Biotechnol.* 2011, 48, 201–209.
- 96.Huy, N.-X.; Tien, N.-Q.-D.; Kim, M.-Y.; Kim, T.-G.; Jang, Y.-S.; Yang, M.-S. Immunogenicity of an S1D epitope from porcine epidemic diarrhea virus

- and cholera toxin B subunit fusion protein transiently expressed in infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2016, 127, 369–380.
97. Ibrahim, A.; Odon, V.; Kormelink, R. Plant Viruses in Plant Molecular Pharming: Toward the Use of Enveloped Viruses. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 803.
98. Ito, T.; Gorman, O. T.; Kawaoka, Y.; Bean, W. J.; Webster, R. G. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* 1991, 65, 5491–8.
99. Iwasaki, A.; Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004, 5(10), 987–95.
100. Izopet, J.; Dubois, M.; Bertagnoli, S.; Lhomme, S.; Marchandeu, S.; Boucher, S.; Kamar, N.; Abravanel, F.; Guérin, J.-L. Hepatitis E Virus Strains in Rabbits and Evidence of a Closely Related Strain in Humans, France. *Emerg Infect Dis* 2012, 18, 1274–1281.
101. Jameel, S.; Zafrullah, M.; Ozdener, M.H.; Panda, S.K. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J. Virol.* 1996, 70, 207–216.
102. Jariyapong, P., Xing, L., van Houten, N. E., Li, T. C., Weerachatanukul, W., Hsieh, B., ... & Cheng, R. H. (2013). Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine*, 31(2), 417-424.
103. Jiang, N.; Zhang, C.; Liu, J.Y.; Guo, Z.H.; Zhang, Z.Y.; Han, C.G.; Wang, Y. Development of Beet necrotic yellow vein virus-based vectors for multiple-gene expression and guide RNA delivery in plant genome editing. *Plant Biotechnol. J.* 2019, 17, 1302–1315.
104. Jiménez de Oya, N.; Escribano-Romero, E.; Blázquez, A.-B.; Lorenzo, M.; Martín-Acebes, M.A.; Blasco, R.; Saiz, J.-C. Characterization of Hepatitis E Virus Recombinant ORF2 Proteins Expressed by Vaccinia Viruses. *J. Virol.* 2012, 86, 7880–7886.

105. Jobling, S. A., Gehrke, L. Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature* 1987, 325, 622–625.
106. Johansson, T.; Enestam, A.; Kronqvist, R.; Schmidt, M.; Tuominen, N.; Weiss, S. A.; Oker-Blom, C. Synthesis of soluble rubella virus spike proteins in two lepidopteran insect cell lines: large scale production of the E1 protein. *J Biotechnol.* 1996, 50 (2-3), 171–178.
107. Joung, Y. H.; Park, S. H.; Moon, K.-B.; Jeon, J.-H.; Cho, H.-S.; Kim, H.-S. The Last Ten Years of Advancements in Plant-Derived Recombinant Vaccines against Hepatitis B. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1715.
108. Kapusta, J.; Modelska, A.; Figlerowicz, M.; Pniewski, T.; Letellier, M.; Lisowa, O.; Yusibov, V.; Koprowski, H.; Plucienniczak, A.; Legocki, A. B. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1999, 13, 1796–1799.
109. Kapusta, J.; Modelska, A.; Pniewski, T.; Figlerowicz, M.; Jankowski, K.; Lisowa, O.; Plucienniczak, A.; Koprowski, H.; Legocki, A.B. Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001, 495, 299–303.
110. Kimberly, S. R.; and Gregory, J. P. New plasmids carrying antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 1995, 165, 141–142.
111. Komarova, T. V.; Baschieri, S.; Donini, M.; Marusic, C.; Benvenuto, E. and Dorokhov, Y. L. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Rev. Vaccines* 2010, 9(8), 859–876.
112. Komarova, T. V.; Skulachev, M. V.; Zvereva, A. S.; Schwartz, A. M.; Dorokhov, Y. L.; Atabekov, J. G. New viral vector for efficient production of target proteins in plants. *Biochemistry (Mosc.)* 2006, 71, 846–850.
113. Komori, T.; Imayama, T.; Kato, N., et al. Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiol* 2007, 145, 1155–1160.



114. Kong, Q.; Richter, L.; Yang, Y. F.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S.; Thanavala, Y. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 11539–11544.
115. Kopertekh, L.; Schiemann, J. Transient Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants: Evolution and Perspectives. *Curr Med Chem.* 2019, 26(3), 365–380.
116. Kratz, P. A.; Botcher, B.; Nassal, M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry* 1999, 96, 1915–1920.
117. Krystal, M.; Elliott, R.M.; Benz, E.W., Jr.; Young, J.F.; Palese, P. Evolution of influenza A and B viruses: Conservation of structural features in the hemagglutinin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 4800–4804.
118. Kumar, G. B.; Ganapathi, T. R.; Revathi, C. J.; Srinivas, L.; Bapat, V. A. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta* 2005, 222, 484–493.
119. Kundu, A.; Avalos, R.; Sanderson, C.; Nayak, D. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol.* 1996, 70, 6508–6515.
120. Kusnadi, A. R.; Nikolov, Z. L.; and Howard, J. A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 56, 473–484.
121. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., ... & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *nature*, 581(7807), 215-220.
122. Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; Wang, X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020, 581(7807), 215-220.

123. Landry, N.; Ward, B.J.; Trepanier, S.; Montomoli, E.; Dargis, M.; Lapini, G.; Vezina, L.P. Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS ONE* 2010, 5, e15559.
124. Lawrence, S. (2004) The Biotech Drug market. *Nature Biotechnology* 2004, 22, 1496.
125. Lebel, M-E; Chartrand, K; Tarrab, E; Savard, P; Leclerc, D; Lamarre, A. Potentiating cancer immunotherapy using papaya mosaic virus-derived nanoparticles. *Nano Lett* 2016, 16(3), 1826–32.
126. LeBlanc, Z.; Waterhouse, P.; Bally, J. Plant-Based Vaccines: The Way Ahead? *Viruses* 2020, 13(1), 5.
127. Leclerc, D. Plant viral epitope display systems for vaccine development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014, 375, 47–59.
128. Lee LY, Gelvin SB. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol.* 2008, 146, 325–332.
129. Letko, M.; Marzi, A.; Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 2020, 5, 562–569.
130. Li, H. Y.; Ramalingam, S.; Chye, M. L. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp. Biol. Med.* 2006, 231, 1346–1352.
131. Li, T.-C.; Takeda, N.; Miyamura, T.; Matsuura, Y.; Wang, J.C.Y.; Engvall, H.; Hammar, L.; Xing, L.; Cheng, R.H. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2005, 79, 12999–13006.
132. Li, Y.; Huang, X.; Zhang, Z.; Li, S.; Zhang, J.; Xia, N.; Zhao, Q. Prophylactic Hepatitis E vaccines: antigenic analysis and serological evaluation. *Viruses* 2020, 12(1), 109.

133. Lico, C.; Chen, Q.; Santi, L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell. Physiol.* 2008, 216, 366–377.
134. Liu, W.; Li, H; Chen, Y. H. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003, 35, 141–146.
135. Liu, W.; Zou, P.; Ding, J.; Lu, Y.; Chen, Y. H. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design . *Microbes and Infection* 2005, 7 (2), 171–177.
136. Liu, Z., Tao, Y. J., & Zhang, J. (2011). Structure and function of the hepatitis E virus capsid related to hepatitis E pathogenesis. *Viral Hepat—Sel. Issues Pathog. Diagnostics [Internet]. In Tech*, 141-152.
137. Liu, Z.; Kearney, C. M. A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and Nicotiana. *J. Biotechnol.* 2010, 147, 151–159.
138. Lomonosoff, G. P. and D’Aoust, M. A. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science* 2016, 353(6305), 1237–40.
139. Love, A.; Chapman, S.; Matic’, S.; Noris, E.; Lomonosoff, G.; Taliansky, M. In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta* 2012, 236, 1305–1313.
140. Maharjan, P. M., Cheon, J., Jung, J., Kim, H., Lee, J., Song, M., ... & Choe, S. (2021). Plant-expressed receptor binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein elicits humoral immunity in mice. *Vaccines*, 9(9), 978.
141. Mallajosyula, J.K.; Hiatt, E.; Hume, S.; Johnson, A.; Jeevan, T.; Chikwamba, R.; Pogue, G.P.; Bratcher, B.; Haydon, H.; Webby, R.J.; et al. Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. *Hum. Vaccine Immunother.* 2014, 10, 586–595.
142. Maloney, B. J.; Takeda, N.; Suzaki, Y.; Ami, Y.; Li, T. C.; Miyamura, T.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S. Challenges in Creating a Vaccine to Prevent Hepatitis E. *Vaccine* 2005, 23, 1870–1874.

143. Mamedov T. et al. Engineering, production and characterization of Spike and Nucleocapsid structural proteins of SARS–CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* as vaccine candidates against COVID-19 //Biorxiv. – 2020. – C. 2020.12. 29.424779.
144. Mamedov, T., Yuksel, D., Gürbüzaslan, I., Ilgın, M., Gulec, B., Mammadova, G., ... & Hasanova, G. (2022). Plant-produced RBD and cocktail-based vaccine candidates are highly effective against SARS-CoV-2, independently of its emerging variants. *bioRxiv*, 2022-04.
145. Mamedov, T., Yuksel, D., Ilgın, M., Gurbuzaslan, I., Gulec, B., Yetiskin, H., ... & Hasanova, G. (2021). Plant-produced glycosylated and in vivo deglycosylated receptor binding domain proteins of SARS-CoV-2 induce potent neutralizing responses in mice. *Viruses* 13 (8), 1595.
146. Margolin, E. A.; Strasser, R.; Chapman, R.; Williamson, A.-L.; Rybicki, E. P.; Meyers, A. E. Engineering the Plant Secretory Pathway for the Production of Next-Generation Pharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* 2020, 38, 1034–1044.
147. Marion, O.; Abravanel, F.; Lhomme, S.; Izopet, J.; Kamar, N. Hepatitis E in Transplantation. *Curr Infect Dis Rep* 2016, 18, 8.
148. Martin, J. E.; Louder, M. K.; Holman, L. A.; Gordon, I. J.; Enama, M. E.; Larkin, B. D.; Andrews, C. A.; Vogel, L.; Koup, R. A.; Roederer, M.; Bailer, R. T.; Gomez, P. L.; Nason, M.; Mascola, J. R.; Nabel, G. J.; Graham, B. S. VRC 301 Study Team. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine* 2008, 26(50), 6338–43.
149. Martinez, C. A.; Guilietti, A. M.; Talou, R. Research advances in plant-made flavi-virus antigens. *Biotechnology Advances* 2012, 30 (6), 1493-505.
150. Mason, H. S.; Lam, D. M.; Arntzen, C.J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 11745–11749.

151. Matić, S.; Rinaldi, R.; Masenga, V.; Noris, E. Efficient production of chimeric Human papillomavirus 16 L1 protein bearing the M2e influenza epitope in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC Biotechnol* 2011, 11, 106.
152. Matthew, P and Ma, J. K-C. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2011, 58 (1), 58–67.
153. Matushek, S.; Beavis, K. G.; Abeleda, A.; Bethel, C.; Hunt, C.; Gillen, S.; Moran, A.; Tesic, V. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *BioRxiv* 2020.
154. Matzeit, V.; Schaefer, S.; Kammann, M.; Schalk, H. J.; Schell, J.; Gronenborn, B. Wheat dwarf virus vectors replicate and express foreign genes in cells of monocotyledonous plants. *Plant Cell* 1991, 3, 247–258.
155. Mazalovska, M.; Varadinov, N.; Koynarski, T.; Minkov, I.; Teoharov, P.; Lomonosoff, G.P.; Zahmanova, G. Detection of Serum Antibodies to Hepatitis E Virus Based on HEV Genotype 3 ORF2 Capsid Protein Expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Ann. Lab. Med.* 2017, 37, 313–319.
156. Mbewana, S.; Mortimer, E.; Pêra, F. F. P. G.; Hitzeroth, I. I.; Rybicki, E. P. Production of H5N1 influenza virus matrix protein 2 ectodomain protein bodies in tobacco plants and in insect cells as a candidate universal influenza vaccine. *Front Bioeng Biotechnol* 2015, 3, 197.
157. McAtee, C. P.; Zhang, Y.; Yarbough, P. O.; Bird, T.; Fuerst, T. R. Purification of a soluble hepatitis E open reading frame 2-derived protein with unique antigenic properties. *Protein Expr. Purif.* 1996, 8, 262–270.
158. McCormick, A. A.; Reddy, S.; Reinl, S. J. et al. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin’s lymphoma: safety and immunogenicity in a Phase I clinical study. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008, 105, 10131–10136.
159. McCown, M. F.; Pekosz, A. Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *Journal of Virology* 2006, 80 (16), 8178–8189.

160. McDonald, W. F.; Huleatt, J. W.; Foellmer, H. G.; Hewitt, D.; Tang, J.; Desai, P., et al. A West Nile virus recombinant protein vaccine that co-activates innate and adaptive immunity. *J Infect Dis* 2007, 195, 1607–17.
161. Mechtcheriakova, I. A.; Eldarov, M. A.; Nicholson, L.; Shanks, M.; Skryabin, K. G.; Lomonossoff, G. P. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. *J. Virol. Methods* 2006, 131, 10–15.
162. Mellado-Sánchez, M.; McDiarmid, F.; Cardoso, V.; Kanyuka, K.; MacGregor, D. R. Virus-Mediated Transient Expression Techniques Enable Gene Function Studies in Black-Grass. *Plant Physiol.* 2020, 183, 455–459.
163. Meng, J.; Dai, X.; Chang, J. C.; Lopareva, E.; Pillot, J.; Fields, H. A.; Khudyakov, Y. E. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 2001, 288, 203–211.
164. Meng, X. J. Hepatitis E Virus. In *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed.; Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2008; pp. 377–383, ISBN 978-0-12-374410-4.
165. Meshcheriakova, Y. A.; El'darov, M. A.; Migunov, A. I.; Stepanova, L. A.; Repko, I. A.; Kiselev, O. I.; Lomonosov, D. P.; Skriabin, K. G. Cowpea mosaic virus chimeric particles bearing ectodomain of matrix protein 2 (M2E) of influenza A virus: production and characteristics. *Mol Biol (Mosk)*. 2009, 43(4), 741–50.
166. Mett, V.; Musiychuk, K.; Bi, H.; Farrance, C. E.; Horsey, A.; Ugulava, N.; Shoji, Y.; de la Rosa, P.; Palmer, G. A.; Rabindran, S.; et al. A plant-produced influenza subunit vaccine protects ferrets against virus challenge. *Influenza Other Respir. Viruses* 2008, 2, 33–40.
167. Modjarrad, K.; Roberts, C. C.; Mills, K. T.; Castellano, A. R.; Paolino, K.; Muthumani, K.; Reuschel, E. L.; Robb, M. L.; Racine, T.; Oh, M. D.; 'Lamarre, C.; Zaidi, F. I.; Boyer, J.; Kudchodkar, S. B.; Jeong, M.; Darden, J. M.; Park, Y. K.; Scott, P. T.; Remigio, C.; Parikh, A. P.; Wise, M. C.; Patel, A.; Duperret, E. K.; Kim, K. Y.; Choi, H.; White, S.; Bagarazzi, M.; May, J. M.; Kane, D.; Lee, H.; Kobinger, G.; Michael, N. L.; Weiner, D.

- B.; Thomas, S. J.; Maslow, J. N. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet Infect Dis.* 2019, 19(9), 1013–1022.
168. Moeller, A.; Kirchdoerfer, R. N.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Wilson, I. A. Organization of the influenza virus replication machinery . *Science* 2012, 338 (6114), 1631–1634.
169. Mohsen, M. O.; Gomes, A. C.; Vogel, M.; Bachmann, M. F. Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System. *Vaccines* 2018, 6, 37.
170. Mohsen, M. O.; Zha, L.; Cabral-Miranda, G.; Bachmann, M. F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* 2017, 34, 123–132.
171. Moon, K. B., Jeon, J. H., Choi, H., Park, J. S., Park, S. J., Lee, H. J., ... & Kim, H. S. (2022). Construction of SARS-CoV-2 virus-like particles in plant. *Scientific reports*, 12(1), 1005.
172. Mortimer, C.; Dugdale, B.; Waterhouse, P. Development of an autonomously replicating viral expression system tailored for *Catharanthus roseus*. *Plant Biotechnol. J.* 2020, 18, 1115–1117.
173. Mortimer, E.; Maclean, J. M.; Mbewana, S.; Buys, A.; Williamson, A. L.; Hitzeroth, I. I.; Rybicki, E. P. Setting up a platform for plant-based influenza virus vaccine production in South Africa. *BMC Biotechnol.* 2012, 12, 14.
174. Mould, J. A.; Drury, J. E.; Frings, S. M.; Kaupp, U. B.; Pekosz, A.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. Permeation and activation of the M2 ion channel of influenza A virus. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275 (40), 31038–31050.
175. Nabel, G. J. Designing Tomorrow's Vaccines. *N Engl J Med.* 2013, 368, 551–560.

176. Nagyová, A.; Subr, Z. Infectious full-length clones of plant viruses and their use for construction of viral vectors. *Acta Virol.* 2007, 51, 223–237.
177. Nahampun, H. N.; Bosworth, B.; Cunnick, J.; Mogler, M.; Wang, K. Expression of H3N2 nucleoprotein in maize seeds and immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep.* 2015, 34, 969–980.
178. Nates, S. V.; Mersich, S. E.; Damonte, E. B.; Zapata, M. T. Comparison of immune response to rubella virus proteins in early and late natural infections. *Microbiologica* 1989, 12, 335–338.
179. Natilla, A.; Hammond, R. W.; Nemchinov, L. G. Epitope presentation system based on cucumber mosaic virus coat protein expressed from a potato virus X-based vector. *Arch Virol.* 2006, 151(7), 1373–86.
180. Neiryneck, S.; Deroo, T.; Saelens, X.; Vanlandschoot, P.; Jou, W. M.; Fiers, W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.* 1999, 10, 1157–1163.
181. Neiryneck, S.; Deroo, T.; Saelens, X.; Vanlandschoot, P.; Jou, W.M.; Fiers, W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med.* 1999, 5, 1157–1163.
182. Nemchinov, L. G.; Natilla, A. Transient expression of the ectodomain of matrix protein 2 (M2e) of avian influenza A virus in plants. *Protein Expr Purif.* 2007, 56(2):153–9.
183. Neuhaus, V.; Chichester, J. A.; Ebensen, T.; Schwarz, K.; Hartman, C. E.; Shoji, Y.; Guzmán, C. A.; Yusibov, V.; Sewald, K.; Braun, A. A new adjuvanted nanoparticle-based H1N1 influenza vaccine induced antigen-specific local mucosal and systemic immune responses after administration into the lung. *Vaccine* 2014, 32, 3216–3222.
184. Neumann, G.; Noda, T.; Kawaoka, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009, 459 (7249), 931–939.
185. Nyon, M. P.; Du, L.; Tseng, C. K.; Seid, C. A.; Pollet, J.; Naceanceno,



- K. S.; Agrawal, A.; Algaissi, A.; Peng, B. H.; Tai, W.; Jiang, S.; Bottazzi, M. E.; Strych, U.; Hotez, P. J. Engineering a stable CHO cell line for the expression of a MERS-coronavirus vaccine antigen. *Vaccine* 2018, 27, 36(14), 1853–1862.
186. O'Kennedy, M. M., Abolnik, C., Smith, T., Motlou, T., Goosen, K., Sepotokele, K. M., ... & Lemmer, Y. (2023). Immunogenicity of adjuvanted plant-produced SARS-CoV-2 Beta spike VLP vaccine in New Zealand white rabbits. *Vaccine*, 41(13), 2261-2269.
187. Oliveira-Filho, E.F.; Bank-Wolf, B.R.; Thiel, H.-J.; König, M. Phylogenetic Analysis of Hepatitis E Virus in Domestic Swine and Wild Boar in Germany. *Veterinary Microbiology* 2014, 174, 233–238.
188. Ooi, A.; Tan, S.; Mohamed, R.; Rahman, N. A.; Othman, R. Y. The full-length clone of cucumber green mottle mosaic virus and its application as an expression system for Hepatitis B surface antigen. *J. Biotechnol.* 2006, 121, 471–481.
189. Palese, P.; García-Sastre, A. Influenza vaccines: present and future. *J Clin Invest.* 2002, 110 (1), 9–13.
190. Pang, E. L.; Peyret, H.; Ramirez, A.; Loh, H. S.; Lai, K. S.; Fang, C. M.; Rosenberg, W. M.; Lomonossoff, G. P. Epitope Presentation of Dengue Viral Envelope Glycoprotein Domain, I.I.I. on Hepatitis B Core Protein Virus-Like Particles Produced in *Nicotiana benthamiana*. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 455.
191. Parvez, K. The hepatitis E virus nonstructural polyprotein. *Future Microbiology* 2017, 12(10), 915–924.
192. Paul, M.; Ma, J. K-C. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2011, 58, 58–67.
193. Peiris, M.; Yam, W.; Chan, K.; Ghose, P.; Shortridge, K. Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, 10 (37), 3426–3427.

194. Perez Filgueira, D. M.; Zamorano, P. I.; Dominguez, M. G., et al. Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine* 2003, 21, 4201–4209.
195. Perrenoud, G.; Messerli, F.; Thierry, A. C.; Beltraminelli, N.; Cousin, P.; Fasel, N.; Vallet, V.; Demotz, S.; Duchosal, M. A.; Moulon, C. A recombinant rubella virus E1 glycoprotein as a rubella vaccine candidate. *Vaccine* 2004, 23, 480–488.
196. Petukhova, N. V.; Gasanova, T. V.; Ivanov, P. A.; Atabekov, J. G. High-level systemic expression of conserved influenza epitope in plants on the surface of rod-shaped chimeric particles. *Viruses* 2014, 6(4), 1789–800.
197. Petukhova, N. V.; Gasanova, T. V.; Stepanova, L. A.; Rusova, O. A.; Potapchuk, M. V.; Korotkov, A. V.; Skurat, E. V.; Tsybalova, L. M.; Kiselev, O. I.; Ivanov, P. A.; Atabekov, J. G. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by tobacco mosaic virus-based vectors. *Curr. Pharm. Des.* 2013, 19, 5587–5600.
198. Peyret, H. A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants. *J. Virol. Methods* 2015, 225, 59–63.
199. Peyret, H. and Lomonossoff, G. P. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol. J.* 2015, 13, 1121–1135.
200. Peyret, H.; Gehin, A.; Thuenemann, E. C.; Blond, D.; El Turabi, A.; Beales, L.; Clarke, D.; Gilbert, R. J. C.; Fry, E. E.; Stuart, D. I.; et al. Tandem Fusion of Hepatitis B Core Antigen Allows Assembly of Virus-Like Particles in Bacteria and Plants with Enhanced Capacity to Accommodate Foreign Proteins. *PLoS ONE* 2015, 10, e0120751.
201. Peyret, H.; Lomonossoff, G. P. When plant virology met *Agrobacterium*: The rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol. J.* 2015, 13, 1121–1135.

202. Peyret, H.; Steele, J. F. C.; Jung, J-W.; Thuenemann, E. C., Meshcheriakova, Yu. and Lomonossoff, G. P. Producing Vaccines against Enveloped Viruses in Plants: Making the Impossible, Difficult. *Vaccines* 2021, 9(7), 780.
203. Pham, N.B.; Ho, T.T.; Nguyen, G.T.; Le, T.T.; Le, N.T.; Chang, H.C.; Pham, M.D.; Conrad, U.; Chu, H.H. Nanodiamond enhances immune responses in mice against recombinant HA/H7N9 protein. *J. Nanobiotechnol.* 2017, 15, 69.
204. Phan, H. T.; Hause, B.; Hause, G.; Arcalis, E.; Stoger, E.; Maresch, D.; Altmann, F.; Joensuu, J.; Conrad, U. Influence of elastin-like polypeptide and hydrophobin on recombinant hemagglutinin accumulations in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE* 2014, 9, e99347.
205. Phan, H. T.; Pham, V.T.; Ho, T. T.; Pham, N. B.; Chu, H. H.; Vu, T. H.; Abdelwhab, E. M.; Scheibner, D.; Mettenleiter, T. C.; Hanh, T. X.; et al. Immunization with Plant-Derived Multimeric H5 Hemagglutinins Protect Chicken against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1. *Vaccines* 2020, 8, 593.
206. Phan, H. T.; Pohl, J.; Floss, D. M.; Rabenstein, F.; Veits, J.; Le, B. T.; Chu, H. H.; Hause, G.; Mettenleiter, T.; Conrad, U. ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice. *Plant Biotechnol. J.* 2013, 11, 582–593.
207. Phan, H.T.; Gresch, U.; Conrad, U. In vitro-Formulated Oligomers of Strep-Tagged Avian Influenza Haemagglutinin Produced in Plants Cause Neutralizing Immune Responses. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018, 6, 115.
208. Phan, H.T.; Ho, T.T.; Chu, H.H.; Vu, T.H.; Gresch, U.; Conrad, U. Neutralizing immune responses induced by oligomeric H5N1-hemagglutinins from plants. *Vet. Res.* 2017, 48, 53.
209. Pillet, S., Arunachalam, P. S., Andreani, G., Golden, N., Fontenot, J., Aye, P. P., ... & Ward, B. J. (2022). Safety, immunogenicity, and protection

- provided by unadjuvanted and adjuvanted formulations of a recombinant plant-derived virus-like particle vaccine candidate for COVID-19 in nonhuman primates. *Cellular & molecular immunology*, 19(2), 222-233.
210. Pillet, S.; Aubin, É.; Trépanier, S.; Bussière, D.; Dargis, M.; Poulin, J. F.; Yassine-Diab, B.; Ward, B.J.; Landry, N. A plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T cell response in healthy adults. *Clin. Immunol.* 2016, 168, 72–87.
211. Pillet, S.; Aubin, É.; Trépanier, S.; Poulin, J. F.; Yassine-Diab, B.; Ter Meulen, J.; Ward, B. J.; Landry, N. Humoral and cell-mediated immune responses to H5N1 plant-made virus-like particle vaccine are differentially impacted by alum and GLA-SE adjuvants in a Phase 2 clinical trial. *NPJ Vaccines* 2018, 3, 3.
212. Pillet, S.; Couillard, J.; Trépanier, S.; Poulin, J.F.; Yassine-Diab, B.; Guy, B.; Ward, B.J.; Landry, N. Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and  $\geq 50$  years old adults. *PLoS ONE* 2019, 14, e0216533.
213. Pillet, S.; Racine, T.; Nfon, C.; Di Lenardo, T. Z.; Babiuk, S.; Ward, B. J.; Kobinger, G. P.; Landry, N. Plant-derived H7 VLP vaccine elicits protective immune response against H7N9 influenza virus in mice and ferrets. *Vaccine* 2015, 33, 6282–6289.
214. Pinto, L. H.; Lamb, R. A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 281 (14), 8997–9000.
215. Pniewski, T. The twenty-year story of a plant-based vaccine against hepatitis B: Stagnation or promising prospects? *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 1978–1998.
216. Pniewski, T.; Kapusta, J.; Bociąg, P.; Wojciechowicz, J.; Kostrzak, A.; Gdula, M.; Fedorowicz-Strońska, O.; Wójcik, P.; Otta, H.; Samardakiewicz, S.; et al. Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for

- prototype plant-derived vaccine tablet formulation. *J. Appl. Genet.* 2011, 52, 125–136.
217. Pogrebnyak, N.; Golovkin, M.; Andrianov, V.; Spitsin, S.; Smirnov, Y.; Egolf, R. and Koprowski, H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102 (25), 9062–9067.
218. Primadharsini, P. P.; Nagashima, S.; Okamoto, H. Genetic Variability and Evolution of Hepatitis E Virus. *Viruses* 2019, 11, 456.
219. Pumpens, P., & Grens, E. (2001). HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*, 44(2-3), 98-114.
220. Purdy, M. A.; Harrison, T. J.; Jameel, S.; Meng, X.-J.; Okamoto, H.; Van der Poel, W. H. M.; Smith, D. B.; Ictv Report Consortium, null ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 2017, 98, 2645–2646.
221. Pyrski, M.; Mieloch, A. A.; Plewiński, A.; Basińska-Barczak, A.; Gryciuk, A.; Bociąg, P.; Murias, M.; Rybka, J. D.; Pniewski, T. Parenteral-Oral Immunization with Plant-Derived HBcAg as a Potential Therapeutic Vaccine against Chronic Hepatitis B. *Vaccines* 2019, 7, 211.
222. Rasochova, L.; Radam, J. M.; Phelps, J. P. and Dang, N. (2007). Recombinant flu vaccines. International Patent application WO2007 / 0011904.
223. Rattanapisit, K.; Shanmugaraj, B.; Manopwisedjaroen, S.; Budi, P.; Purwono, Konlavat Siri wattananon, Narach Khorattanakulchai, Oranicha Hanittinan, Wanuttha Boonyayothin, Arunee Thitithanyanont, Duncan R Smith, Waranyoo Phoolcharoen. Rapid production of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) and spike specific monoclonal antibody CR3022 in *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep* 2020 Oct 19;10(1):17698.
224. Ravin, N. V., Blokhina, E. A., Kuprianov, V. V., Stepanova, L. A., Shaldjan, A. A., Kovaleva, A. A., ... & Skryabin, K. G. (2015). Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of

- hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective efficiency. *Vaccine*, 33(29), 3392-3397.
225. Ravin, N.V.; Kotlyarov, R.Y.; Mardanova, E.S.; Kuprianov, V.V.; Migunov, A.I.; Stepanova, L.A.; Tsybalova, L.M.; Kiselev, O.I.; Skryabin, K.G. Plant-produced recombinant influenza vaccine based on virus-like HBc particles carrying an extracellular domain of M2 protein. *Biochem. Biokhimiia* 2012, 77, 33–40.
226. Richter, L.J.; Thanavala, Y.; Arntzen, C.J.; Mason, H. S. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 1167–1171.
227. Robinson, C. R., & Sauer, R. T. (1998). Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 5929-5934.
228. Rosales-Mendoza, S.; Márquez-Escobar, V. A.; González-Ortega, O.; Nieto-Gómez, R.; Arévalo-Villalobos, J. I. What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? *Vaccines (Basel)*. 2020, 8(2), 183.
229. Royal, J. M., Simpson, C. A., McCormick, A. A., Phillips, A., Hume, S., Morton, J., ... & Pogue, G. P. (2021). Development of a SARS-CoV-2 vaccine candidate using plant-based manufacturing and a tobacco mosaic virus-like nano-particle. *Vaccines*, 9(11), 1347.
230. Ruocco, V., & Strasser, R. (2022). Transient expression of glycosylated SARS-CoV-2 antigens in *Nicotiana benthamiana*. *Plants*, 11(8), 1093.
231. Rybicki, E. P. Plant-based vaccines against viruses. *Viol. J.* 2014, 11, 205.
232. Rybicki, E. P. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discovery Today* 2008, 13, 894–901.

233. Sainsbury, F.; Liu, L.; Lomonossoff, G. P. Cowpea mosaic virus-based systems for the expression of antigens and antibodies in plants. *Methods Mol Biol* 2009, 483, 25–39.
234. Sainsbury, F.; Thuenemann, E. C.; Lomonossoff, G. P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J.* 2009, 7, 682–93.
235. Salazar-González, J. A.; Angulo, C.; Rosales-Mendoza, S. Chikungunya virus vaccines: Current strategies and prospects for developing plant-made vaccines. *Vaccine* 2015, 33, 3650–3658.
236. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition / Fritsch E. F., Maniatis T. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. – 1989.
237. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977, 74(12), 5463-7.
238. Santa Cruz, S.; Chapman, S.; Roberts, A. G.; Roberts, I. M.; Prior, D. A.; Oparka, K. J. Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996, 93, 6286–6290.
239. Schillberg, S.; Finfern, R. Plant molecular farming for the production of valuable proteins—Critical evaluation of achievements and future challenges. *J. Plant Physiol.* 2021, 258–259, 153359.
240. Sehgal, D.; Thomas, S.; Chakraborty, M.; Jameel, S. Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virology* 2006, 3, 38.
241. Seppänen, H.; Huhtala, M. L.; Vaheri, A.; Summers, M. D.; Oker-Blom, C. Diagnostic potential of baculovirus-expressed rubella virus envelope proteins. *J. Clin. Microbiol* 1991, 29(9), 1877–1882.
242. Shajahan, A., Supekar, N. T., Gleinich, A. S., & Azadi, P. (2020). Deducing the N-and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*, 30(12), 981-988.

243. Shin, Y. J., König-Beihammer, J., Vavra, U., Schwestka, J., Kienzl, N. F., Klausberger, M., ... & Strasser, R. (2021). N-glycosylation of the SARS-CoV-2 receptor binding domain is important for functional expression in plants. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 689104.
244. Shoji, Y.; Bi, H.; Musiychuk, K.; Rhee, A.; Horsey, A.; Roy, G.; Green, B.; Shamloul, M.; Farrance, C. E.; Taggart, B.; et al. Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. *Vaccine* 2009, *27*, 1087–1092.
245. Shoji, Y.; Chichester, J. A.; Bi, H.; Musiychuk, K.; de la Rosa, P.; Goldschmidt, L.; Horsey, A.; Ugulava, N.; Palmer, G.A.; Mett, V.; et al. Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate. *Vaccine* 2008, *26*, 2930–2934.
246. Shoji, Y.; Chichester, J. A.; Jones, M.; Manceva, S. D.; Damon, E.; Mett, V. Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. *Hum Vaccines*. 2011, *7*, 41–50.
247. Shoji, Y.; Jones, R. M.; Mett, V.; Chichester, J. A.; Musiychuk, K.; Sun, X.; Tumpey, T. M.; Green, B.J.; Shamloul, M.; Norikane, J.; et al. A plant-produced H1N1 trimeric hemagglutinin protects mice from a lethal influenza virus challenge. *Hum. Vaccine Immunother*. 2013, *9*, 553–560.
248. Shrestha, M. P.; Scott, R. M.; Joshi, D. M.; Mammen, M. P. Jr; Thapa, G. B.; Thapa, N.; Myint, K. S.; Fourneau, M; Kushner, R. A.; Shrestha, S. K. et al. Safety and efficacy of a recombinant Hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 2007, *356*, 895–903.
249. Simanavicius, M.; Juskaite, K.; Verbickaite, A.; Jasiulionis, M.; Tamosiunas, P. L.; Petraityte-Burneikiene, R.; Zvirbliene, A.; Ulrich, R. G.; Kucinskaite-Kodze, I. Detection of Rat Hepatitis E Virus, but Not Human Pathogenic Hepatitis E Virus Genotype 1–4 Infections in Wild Rats from Lithuania. *Veterinary Microbiology* 2018, *221*, 129–133.



250. Siriwattananon, K., Manopwisedjaroen, S., Shanmugaraj, B., Rattanapisit, K., Phumiamorn, S., Sapsutthipas, S., ... & Phoolcharoen, W. (2021). Plant-produced receptor-binding domain of SARS-CoV-2 elicits potent neutralizing responses in mice and non-human primates. *Frontiers in plant science*, 12, 682953.
251. Skryabin, K. G.; Kraev, A. S.; Morozov, S. Yu.; Rozanov, M. N.; Chernov, B. K.; Lukasheva, L. I.; and Atabekov, J. G. The nucleotide sequence of potato virus X RNA. *Nucl. Acids Res.* 1988, 16, 10929–10930.
252. Smith, D. B.; Paddy, J. O.; Simmonds, P. The Use of Human Sewage Screening for Community Surveillance of Hepatitis E Virus in the UK. *Journal of Medical Virology* 2016, 88, 915–918.
253. Smith, D. B.; Simmonds, P. Classification and Genomic Diversity of Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018, 8, a031880.
254. Smith, T.; O’Kennedy, M. M.; Wandrag, D. B. R.; Adeyemi, M.; Abolnik, C. Efficacy of a plant-produced virus-like particle vaccine in chickens challenged with Influenza A H6N2 virus. *Plant Biotechnol. J.* 2020, 18, 502–512.
255. Song, L.; Xiong, D.; Kang, X.; Yang, Y.; Wang, J.; Guo, Y.; Xu, H.; Chen, S.; Peng, D.; Pan, Z. and Jiao, X. An avian influenza A (H7N9) virus vaccine candidate based on the fusion protein of hemagglutinin globular head and Salmonella typhimurium flagellin. *BMC Biotechnology* 2015, 15, 79.
256. Sourrouille, C.; Marshall, B.; Lienard, D.; Faye, L. From Neanderthal to Nanobiotech: From Plant Potions to Pharming with Plant Factories. In *Book: Methods in Molecular Biology: Recombinant Proteins From Plants* / ed. by L. Faye, V. Gomord. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, 2009. P. 1–23.
257. Stanekova, Z.; Adkins, I; Kosova, M; Januli 'kova, J; Sebo, P; Vareckova, E. Heterosubtypic protection against influenza A induced by

- adenylate cyclase toxoids delivering conserved HA2 subunit of hemagglutinin. *Antiviral Res.* 2013, 97 (1), 24–35.
258. Stepanova, L. A.; Kotlyarov, R. Y.; Kovaleva, A. A.; Potapchuk, M. V.; Korotkov, A. V.; Sergeeva, M. V.; Kasianenko, M. A.; Kuprianov, V. V.; Ravin, N. V.; Tsybalova, L. M.; Skryabin, K. G.; Kiselev, O. I. Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS One* 2015, 10(3):e0119520.
259. Stepanova, L. A.; Kotlyarov, R. Y.; Shuklina, M. A.; Blochina, E. A.; Sergeeva, M. V.; Potapchuk, M. V.; Kovaleva, A. A.; Ravin, N. V.; Tsybalova, L. M. Influence of the Linking Order of Fragments of HA2 and M2e of the influenza A Virus to Flagellin on the Properties of Recombinant Proteins. *Acta Naturae* 2018, 10(1), 85–94 (1).
260. Stepanova, L. A.; Kovaleva, A. A.; Potapchuk, M. V.; Korotkov, A. V.; Kupriianov, V. V.; Blokhina, E. A.; Kotliarov, R. Iu.; Tsybalova, L. M. Immunogenicity of recombinant proteins including ectodomain of M2 influenza virus A. Article in Russian. *Vopr Virusol* 2013, 58(3):21–5.
261. Stepanova, L. A.; Mardanova, E. S.; Shuklina, M. A.; Blokhina, E. A.; Kotlyarov, R. Y.; Potapchuk, M. V.; Kovaleva, A. A.; Vidyayeva, I. G.; Korotkov, A. V.; Eletskaia, E. I.; Ravin, N. V.; Tsybalova, L. M. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses A subtypes. *J Biomed Sci.* 2018, 25 (1), 33.
262. Stepanova, L. A.; Shuklina, M. A.; Blokhina, E. A.; Kotlyarov, R. Y.; Kovaleva, A. A.; Ravin, N. V.; Tsybalova, L. M. Effectiveness of cross-protective recombinant influenza vaccine based on conserved epitopes of viral proteins M2 and hemagglutinin. *Journal Infectology* 2017, 9, 43–52.
263. Sui, J.; Hwang, W. C.; Perez, S.; Wei, G.; Aird, D.; Chen, L. M.; Santelli, E.; Stec, B.; Cadwell, G.; Ali, M.; Wan, H.; Murakami, A.; Yammanuru, A.; Han, T.; Cox, N. J.; Bankston, L. A.; Donis, R. O.;

- Liddington, R. C.; Marasco, W. A. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nature Structural & Molecular Biology* 2009, 3 (16), 265–273.
264. Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003, 21, 335–76.
265. Takova, K., Koynarski, T., Minkov, G., Toneva, V., Mardanova, E., Ravin, N., ... & Zahmanova, G. (2021). Development and optimization of an enzyme immunoassay to detect serum antibodies against the hepatitis E virus in pigs, using plant-derived ORF2 recombinant protein. *Vaccines*, 9(9), 991.
266. Tam, A. W.; Smith, M. M.; Guerra, M. E.; Huang, C. C.; Bradley, D. W.; Fry, K. E.; Reyes, G. R. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991, 185, 120–131.
267. Tavares-Esashika, M.L.; Campos, R.N.S.; Blawid, R.; da Luz, L.L.; Inoue-Nagata, A. K.; Nagata, T. Characterization of an infectious clone of pepper ringspot virus and its use as a viral vector. *Arch. Virol.* 2020, 165, 367–375.
268. Thanavala, Y.; Mahoney, M.; Pal, S.; Scott, A.; Richter, L.; Natarajan, N.; Goodwin, P.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 3378–3382.
269. Thanavala, Y.; Yang, Y. F.; Lyons, P.; Mason, H. S.; Arntzen, C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 3358–3361.
270. Thérien, A.; Bédard, M.; Carignan, D., et al. A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. *J Nanobiotechnology* 2017, 15(1), 54.
271. Thuenemann, E. C., Byrne, M. J., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Ferriol, I., ... & Lomonossoff, G. P. (2021). A Replicating viral

- vector greatly enhances accumulation of helical virus-like particles in plants. *Viruses*, 13(5), 885.
272. Thuenemann, E. C.; Lenzi, P.; Love, A. J.; Taliansky, M.; Be'cares, M.; Zun˜iga, S.; Enjuanes, L.; Zahmanova, G. G.; Minkov, I. N.; Matic, S.; Noris, E.; Meyers, A.; Hattingh, A.; Rybicki, E. P.; Kiselev, O. I.; Ravin, N. V.; Eldarov, M. A.; Skryabin, K. G.; Lomonossoff, G. P. The use of transient expression systems for the rapid production of viruslike particles in plants. *Current Pharm Des* 2013, 19, 5564–5573.
273. Tien, N. Q.; Huy, N. X.; Kim, M. Y. Improved expression of porcine epidemic diarrhea antigen by fusion with cholera toxin B subunit and chloroplast transformation in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2019, 137, 213–223.
274. Tong, S.; Zhu, X.; Li, Y.; Shi, M.; Zhang, J.; Bourgeois, M.; Yang, H.; Chen, X.; Recuenco, S.; Gomez, J.; Chen, L. M.; Johnson, A.; Tao, Y.; Dreyfus, C.; Yu, W.; McBride, R.; Carney, P. J.; Gilbert, A. T.; Chang, J.; Guo, Z.; Davis, C. T.; Paulson, J. C.; Stevens, J.; Rupprecht, C. E.; Holmes, E. C.; Wilson, I. A.; Donis, R. O. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2013, 9 (10), e1003657.
275. Torrent, M.; Llompart, B.; Lasserre-Ramassamy, S., et al. Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC Biol* 2009, 7, 5.
276. Torresi, J.; Li, F.; Locarnini, S. A.; Anderson, D. A. Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J Gen Virol* 1999, 80, 1185–1188.
277. Tsarev, S. A.; Tsareva, T. S.; Emerson, S. U.; Govindarajan, S.; Shapiro, M.; Gerin, J. L.; Purcell, R. H. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 10198–10202.
278. Tsarev, S. A.; Tsareva, T. S.; Emerson, S. U.; Govindarajan, S.; Shapiro, M.; Gerin, J. L.; Purcell, R. H. Recombinant vaccine against

- hepatitis E: Dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* 1997, 15, 1834–1838.
279. Tsuda, S.; Yoshioka, K.; Tanaka, T.; Iwata, A.; Yoshikawa, A.; Watanabe, Y.; Okada, Y. Application of the Human Hepatitis B Virus Core Antigen from Transgenic Tobacco Plants for Serological Diagnosis. *Vox Sang.* 1998, 74, 148–155.
280. Tsybalova, L. M.; Stepanova, L. A.; Kotlyarov, R. Y.; Blokhina, E. A.; Shuklina, M. A.; Mardanova, E. S.; Korotkov, A.; Potapchuk, M. V.; Ravin, N. V. Strengthening the Effectiveness of the Candidate Influenza Vaccine by Combining Conserved Sequences of Hemagglutinin and M2 protein. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2017, 16 (3), 65-70.
281. Tsybalova, L. M.; Stepanova, L. A.; Shuklina, M. A.; Mardanova, E. S.; Kotlyarov, R. Y.; Potapchuk, M. V.; Petrov, S. A.; Blokhina, E. A.; Ravin, N. V. Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine. *PLoS One* 2018, 13 (8): e0201429.
282. Tyagi, S.; Korkaya, H.; Zafrullah, M.; Jameel, S.; Lal, S.K. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 22759–22767.
283. Tyulkina, L. G.; Skurat, E. V.; Frolova, O.Yu.; Komarova, T. V.; Karger, E. M. and Atabekov, I. G. New Viral Vector for Superproduction of Epitopes of Vaccine Proteins in Plants. *Acta Naturae* 2011, 3(4), 73–82.
284. Uhde, K.; Fischer, R.; Commandeur, U. Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of potato virus X particles. *Arch. Virol.* 2005, 150, 327–340.
285. van Doremalen, N.; Haddock, E.; Feldmann, F.; Meade-White, K., Bushmaker, T.; Fischer, R. J.; Okumura, A.; Hanley, P. W.; Saturday, G.; Edwards, N. J.; Clark, M. H. A.; Lambe, T.; Gilbert, S. C.; Munster, V. J. A single dose of ChAdOx1 MERS provides protective immunity in rhesus

- macaques. *Sci Adv.* 2020, 6(24):eaba8399.
286. Volz, A.; Kupke, A.; Song, F.; Jany, S.; Fux, R.; Shams-Eldin, H.; Schmidt, J.; Becker, C.; Eickmann, M.; Becker, S.; Sutter, G. Protective Efficacy of Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Delivering Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein. *J Virol.* 2015, 89(16), 8651–6.
287. Walls, A. C.; Park, Y. J.; Tortorici, M. A.; Wall, A.; McGuire, A. T.; Veessler, D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 2020, 181, 281–292.
288. Wang, L.; Wang, Y. C.; Feng, H.; Ahmed, T.; Compans, R. W.; Wang, B. Z. Virus-like particles containing the tetrameric ectodomain of influenza matrix protein 2 and flagellin induce heterosubtypic protection in mice. *Biomed Res Int.* 2013, 2013, 686549.
289. Wang, T. T.; Tan, G. S.; Hai, R.; Pica, N.; Ngai, L.; Ekiert, D. C., et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010, 107, 18979–18984.
290. Ward, B. J., Gobeil, P., Séguin, A., Atkins, J., Boulay, I., Charbonneau, P. Y., ... & Landry, N. (2021). Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nature medicine*, 27(6), 1071-1078.
291. Ward, B. J.; Makarkov, A.; Séguin, A.; Pillet, S.; Trépanier, S.; Dhaliwall, J.; Libman, M. D.; Vesikari, T.; Landry, N. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥65 years): Two multicentre, randomised phase 3 trials. *Lancet* 2020, 396, 1491–1503.
292. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, 369(6501), 330-333.

293. Webster, R. G.; Bean, W. J.; Gorman, O. T.; Chambers, T. M.; Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992, 56, 152–79.
294. Wei, M.; Zhang, X.; Yu, H.; Tang, Z.-M.; Wang, K.; Li, Z.; Zheng, Z.; Li, S.; Zhang, J.; Xia, N.; et al. Bacteria Expressed Hepatitis E Virus Capsid Proteins Maintain Virion-like Epitopes. *Vaccine* 2014, 32, 2859–2865.
295. Whitehead, M.; Ohlschläger, P.; Almajhdi, F. N., et al. Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein bodies cause tumour regression in mice. *BMC Cancer* 2014, 14, 367.
296. Wigdorovitz, A.; Pérez Fuilgueira, D. M.; Robertson, N. et al. Protection of mice against challenge with Foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant Tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein. *Virology* 1999, 264, 85–91.
297. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., ... & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263.
298. Wu, C.; Wu, X.; Xia, J. Hepatitis E Virus Infection during Pregnancy. *Virology Journal* 2020, 17, 73.
299. Xing, L.; Wang, J. C.; Li, T. C.; Yasutomi, Y.; Lara, J.; Khudyakov, Y., et al. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol* 2011; 85:1117–24.
300. Yamashita, T.; Mori, Y.; Miyazaki, N.; Cheng, R.H.; Yoshimura, M.; Unno, H.; Shima, R.; Moriishi, K.; Tsukihara, T.; Li, T.C.; et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 12986–12991.
301. Yang, N.; Peng, C.; Cheng, D.; Huang, Q.; Xu, G.; Gao, F.; Chen, L. The over-expression of calmodulin from Antarctic notothenioid fish increases cold tolerance in tobacco. *Gene* 2013, 521, 32–37.

302. Yu, X. Y.; Chen, Z. P.; Wang, S. Y.; Pan, H. R.; Wang, Z. F.; Zhang, Q. F.; Shen, L. Z.; Zheng, X. P.; Yan, C. F., Lu, M., et al () Safety and immunogenicity of Hepatitis E vaccine in elderly people older than 65years. *Vaccine* 2019, 37, 4581–4586.
303. Yusibov, V.; Modelska, A.; Steplewski, K.; Agadjanyan, M.; Weiner, D.; Hooper, D. C.; Koprowski, H. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 5784–5788.
304. Yusibov, V.; Rabindran, S. Resent progress in the development of plant-derived vaccines. *Expert Reviews of Vaccines*. 2008, 7, 1173–1183.
305. Yusibov, V.; Streatfield, S.; Kushnir, N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals. *Human Vaccines* 2011, 7 (3), 313–321.
306. Zafrullah, M.; Ozdener, M. H.; Kumar, R.; Panda, S. K.; Jameel, S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* 1999, 73, 4074–4082.
307. Zahmanova, G. G., Mazalovska, M., Takova, K. H., Toneva, V. T., Minkov, I. N., Mardanova, E. S., ... & Lomonossoff, G. P. (2019). Rapid high-yield transient expression of swine hepatitis E ORF2 capsid proteins in *Nicotiana benthamiana* plants and production of chimeric hepatitis E virus-like particles bearing the M2e influenza epitope. *Plants*, 9(1), 29.
308. Zhang, C.; Bradshaw, J. D.; Whitham, S. A.; Hill, J. H. The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiol.* 2010, 153, 52–65.
309. Zhang, J; Zhang, X. F.; Huang, S. J.; Wu, T.; Hu, Y. M.; Wang, Z. Z.; Wang, H.; Jiang, H. M.; Wang, Y. J.; Yan, Q., et al. Long-term efficacy of a Hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 2015, 372, 914–922.



310. Zhang, Y.; McAtee, P.; Yarbough, P.O.; Tam, A.W.; Fuerst, T. Expression, Characterization, and Immunoreactivities of a Soluble Hepatitis E Virus Putative Capsid Protein Species Expressed in Insect Cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997, 4, 423–428.
311. Zheng, N.; Xia, R.; Yang, C.; Yin, B.; Li, Y.; Duan, C.; Liang, L.; Guo, H.; Xie, Q. Boosted expression of the SARS-CoV nucleocapsid protein in tobacco and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 2009, 27, 5001–5007.
312. Zhu, F. C.; Zhang, J.; Zhang, X. F.; Zhou, C.; Wang, Z. Z.; Huang, S. J.; Wang, H.; Yang, C. L.; Jiang, H. M.; Cai, J. P., et al (2010) Efficacy and safety of a recombinant Hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebocontrolled, phase 3 trial. *Lancet* 376, 895–902.
313. Zimran, A., Brill-Almon, E., Chertkoff, R., Petakov, M., Blanco-Favela, F., Munoz, E. T., ... & Aviezer, D. (2011). Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(22), 5767-5773.
314. Букринская, А. Г. Гл. 11. Семейство ортомиксовирусов (Orthomyxoviridae) . Вирусология / Рецензенты: В. Е. Яворовская, Л. Б. Борисов.. — М. : Медицина, 1986. — Ч. II : Частная вирусология. — С. 274–288. — 336 с.
315. Киселев О. И., Цыбалова Л. М., Покровский В. И. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство». 2012. С. 320–380.
316. Комарова Т. В., Скулачев М. В., Зверева А. С., Шварц А. М., Дорохов Ю. Л., Атабеков И. Г. (2006) Новый вирус-вектор для эффективной продукции целевых белков в растениях. *Биохимия*, 71(8), 1043–1049.

317. Ожаровская Т. А., О. В. Зубкова, И. В. Должикова, А. С. Громова, Д. М. Гроусова, А. И. Тухватулин, О. Попова, Д. В. Щебляков, Д. Н. Щербинин, А. Ш. Джаруллаева, А. С. Ерохова, М. М. Шмаров, С. Я. Логинова, С. В. Борисевич, Б. С. Народицкий, Д. Ю. Логунов, and А. Л. Гинцбург. 2019. “Иммуногенность Различных Форм Гликопротеина s Корунавируса Ближневосточного Респираторного Синдрома.” *Acta Naturae* 11(1 (40)):38–47.
318. П. А. Белавин, Д. А. Кунык, Е. В. Протопопова, В. Б. Локтев, Е. В. Дейнеко. Создание кандидатной вакцины против клещевого энцефалита на основе гибридного рекомбинантного flagG-protE-белка. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(8):986–992.
319. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004.