

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

МОСКВА – 2024 г.

Работа выполнена в лаборатории систем молекулярного клонирования Института Биоинженерии им. К.Г. Скрябина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук»

**Научный консультант:** **Равин Николай Викторович**, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Васин Андрей Владимирович**  
доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт биомедицинских систем и биотехнологий

**Гущин Владимир Алексеевич**  
доктор биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, отдел арбовирусов, заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов

**Морозов Сергей Юрьевич**  
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», заведующий лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского

Защита диссертации состоится 11 апреля 2024 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.4/2849>

Автореферат разослан                      февраля 2024 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Успехи в области генетической инженерии растений, исследования 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 ряд преимуществ 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, может быть 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 обычно низкой эффективностью экспрессии. Альтернативой трансгенным растениям является транзистная (временная) экспрессия в нетрансгенном растении. При транзистной экспрессии ДНК обычно не включается в ядерный геном, но в клетке может присутствовать большое количество копий мРНК гена интереса, что обеспечивает высокий уровень синтеза белка. Данный способ связан с использованием природных свойств почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, способной переносить определенный участок своей ДНК (Т-ДНК) в растительную клетку. Самым популярным растением, применяемым для транзистной экспрессии, является *Nicotiana benthamiana*. Свою популярность оно 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 кандидатной вакцины от COVID-19 спустя 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 X вирус картофеля. На его основе была создана серия

векторов для экспрессии рекомбинантных белков в *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.

### **Цель и задачи исследования**

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 гемагглютинина, присоединенных к бактериальному флагеллину.
5. Экспрессия в растениях вирусоподобных частиц, образуемых капсидным белком вируса гепатита Е, и 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.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Разработаны новые высокоэффективные самореплицирующиеся 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, – M2e пептида и участка второй субъединицы гемагглютинина. Для повышения иммуногенности эти антигены были присоединены к высокимуногенным белкам-носителям, – ядерному антигену вируса гепатита В, флагеллину *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 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 значимость** работы обусловлена возможностью использования разработанных экспрессионных векторов для продукции различных рекомбинантных белков в растениях. Разработанные кандидатные вакцины 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 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.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Рекомбинантные векторы на основе генома X вируса картофеля могут быть использованы для транзientной экспрессии рекомбинантных белков в растениях, в цитозоле и в эндоплазматическом ретикулуме. 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.
2. Ядерный антиген вируса гепатита В, к которому присоединен M2e пептид вируса гриппа А, полученный в растительной системе экспрессии, образует *in vivo* вирусоподобные частицы сферической формы. Препарат вызывает эффективный иммунный ответ против M2e и обеспечит защиту от летальной гриппозной инфекции.

3. Химерный белок, содержащий флагеллин *S. typhimurium*, соединенный с четырьмя tandemными копиями M2e пептида вируса гриппа А, эффективно экспрессируется в растениях. Интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным белком индуцирует высокие уровни M2e-специфических сывороточных антител и обеспечивает защиту против летальной гриппозной инфекции. Этот белок может быть использован в качестве основы кандидатной «растительной» вакцины от гриппа А, которую можно вводить интраназально.
4. Химерный белок, содержащий флагеллин с присоединенными к нему консервативным фрагментом гемагглютинаина и четырьмя копиями M2e пептида вируса гриппа А, эффективно экспрессируется в растениях. Интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным белком индуцирует высокие уровни M2e-специфических сывороточных антител при слабом иммунном ответе в отношении гемагглютинаина и обеспечивает защиту против летальной гриппозной инфекции. Этот белок также может быть использован в качестве основы кандидатной «растительной» вакцины от гриппа А, которую можно вводить интраназально.
5. Укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита Е способен экспрессироваться в растениях, образовывать *in vivo* вирусоподобные частицы и вызывать выработку антител к вирусу гепатита Е на высоком уровне. Этот белок может быть использован для разработки кандидатных вакцин от вируса гепатита Е и диагностикумов.
6. Укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита Е при экспрессии в растениях может быть использован в качестве носителя чужеродных антигенов, таких как M2e пептид вируса гриппа А или RBD фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2.
7. RBD фрагмент S белка коронавируса SARS-CoV-2 (RBD), RBD фрагмент слитый с четырьмя копиями M2e пептида вируса гриппа А, а также эти белки, присоединенные к флагеллину бактерии *S. typhimurium*, могут быть получены в растительной системе экспрессии. Белок, включающий флагеллин, RBD и M2e, может быть использован в качестве вакцинного кандидата против гриппа А и COVID-19, который можно вводить интраназально.

#### **Личный вклад соискателя**

Большинство исследований, вошедших в диссертацию, выполнено непосредственно самим соискателем или под его руководством. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, в обработке экспериментальных данных, в написании публикаций и текста диссертации.

Эксперименты на лабораторных животных выполнялись в сотрудничестве с ФГБУ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева Минздрава России.

### **Степень достоверности результатов**

В работе использованы современные методы исследования. Эксперименты проводились на современном оборудовании с использованием реактивов от ведущих российских и международных компаний. Обработка результатов осуществлялась с помощью адекватных методов анализа. Все результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы.

### **Апробация результатов**

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

### **Структура и объем диссертации**

Материалы диссертации изложены на 241 страницах машинописного текста и включают 109 рисунков и 12 таблиц. Диссертация состоит из разделов: “Содержание”, “Введение”, “Обзор литературы”, “Цель и задачи работы”, “Материалы и методы”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Выводы”, “Список работ, опубликованных по теме диссертации”, “Список литературы”, который содержит 6 отечественных и 313 иностранных источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

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

В работе для получения рекомбинантных белков в растениях использовали метод транзientной экспрессии в *N.benthamiana*. Для переноса генов в клетки растения агробактерии, содержащие бинарные векторы, вводят в растения с помощью шприца либо с помощью вакуумной инфильтрации.

Для повышения эффективности векторов используют различные подходы. Это использование самореплицирующихся вирусных векторов, трансляционных энхансеров, супрессоров ген-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 был использован вектор PVXdt\_GFP на основе генома X вируса картофеля (ХВК) [Комарова и др. 2006], основанный на геноме ХВК штамма UK3 (GenBank M95516). Он 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. 1). Вся эта конструкция помещена между 35S промотором и терминатором и клонирована в бинарном векторе pBIN19 [Bevan *et al.*, 1984].

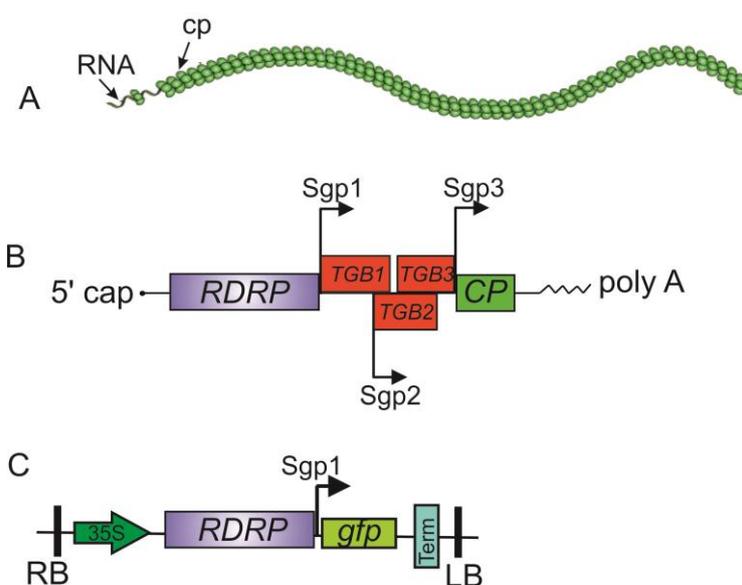


Рисунок 1. Структура вириона (А) и генома X-вируса картофеля (В). Схема экспрессионного вектора pA7248 (С). Показаны гены РНК-зависимой РНК полимеразы (RDRP), тройной блок генов (TGB1, TGB2 и TGB3), ген белка оболочки (CP), Sgp1, Sgp2, Sgp2 – промоторы субгеномных РНК ХВК; 35S – промотор, Term – терминатор, *gfp* – ген зеленого флуоресцентного белка, LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

Для повышения эффективности данного вектора, а также удобства манипуляций нами были произведены его модификации.

На первом этапе была осуществлена модификация данного вектора таким образом, чтобы клонирование целевого гена могло быть осуществлено в один этап. Сконструированный вектор дает возможность осуществлять клонирование целевого гена в один этап с использованием уникальных сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции *AscI* и *SmaI*.

На следующем этапе вирусная система экспрессии была оптимизирована за счет повышения эффективности трансляции мРНК целевого гена. В экспрессионном векторе в 5'-НТО целевого гена вводили трансляционный энхансер – лидерную последовательность РНК вируса мозаики люцерны (AMV). Ранее было показано, 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 pA7248AMV, содержащий энхансер AMV в 5'-НТО целевого гена *gfp*. Было показано, что введение трансляционного энхансера AMV повышает уровень продукции GFP в растении *N. benthamiana* в 3-4 раза за счет повышения эффективности трансляции.

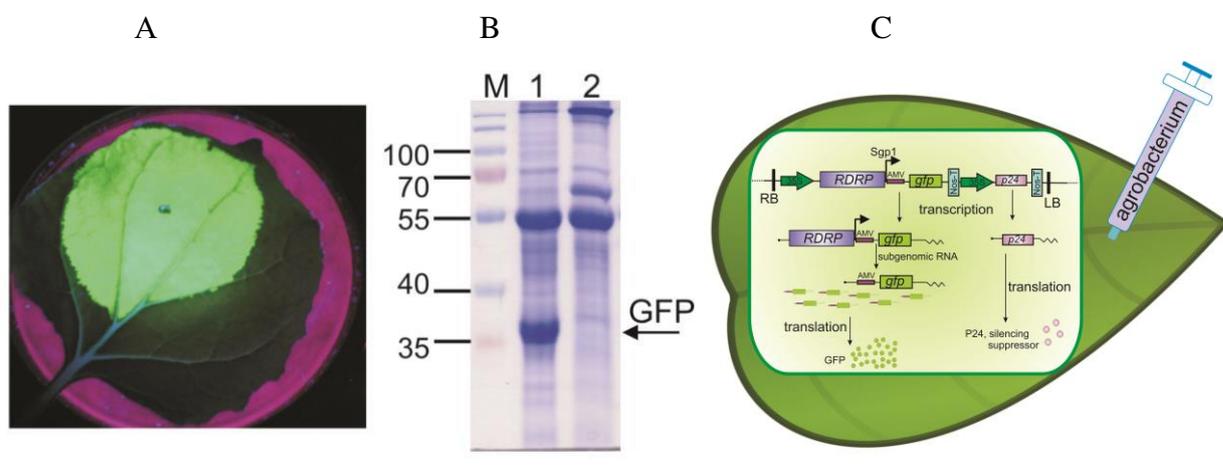
На следующем этапе мы уменьшали размер экспрессионного вектора. Бинарный вектор pEAQselectK [Sainsbury *et al.*, 2009] использовали в качестве основы. Уменьшение размера вектора упрощает генно-инженерные манипуляции. Также было показано, что уменьшение размера “backbone” в полученном pEf-GFP векторе увеличивает уровень экспрессии белка примерно на 40% по сравнению с исходным вектором pA7248AMV.

Посттранскрипционный сайленсинг генов является одним из наиболее важных факторов, ограничивающих эффективность экспрессии рекомбинантных белков в растениях [Chicas and Macino, 2001]. На экспрессию GFP сайленсинг не оказал значительного отрицательного воздействия, однако эта проблема оказалась более важной для экспрессии «немодельных» белков. На первом этапе мы оценили эффективность двух супрессоров сайленсинга, P24 из вируса скрученных листьев виноградной лозы и P19 из вируса кустистой карликовости томатов, в нашей векторной системе. При одновременном введении в растения векторов, кодирующих целевой белок и белок-супрессор сайленсинга, были получены результаты, показывающие, что оба супрессора сайленсинга увеличивают уровень экспрессии GFP примерно в 3 раза. Для дальнейшей работы нами был выбран P24.

На следующем этапе нами был создан вектор pEff-GFP, содержащий две кассеты экспрессии в пределах одного вектора. Первая кассета экспрессии содержала промотор

35S, 5'-НТО ХВК, RDRP, Sgp1, *gfp*, 3'-НТО ХВК и Nos-T, а вторая кассета содержала промотор 35S, ген 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, полученным при совместной инфильтрации двух плазмид. Мы обнаружили, что уровень продукции GFP был близким для двух вариантов.

В оптимальных условиях вектор pEff-GFP обеспечивает уровень экспрессии GFP около 30% от общего растворимого белка (рис. 2), что соответствует примерно 1 мг / г свежей ткани листьев.



**Рисунок 2.** Зеленый флуоресцентный белок эффективно синтезируется в клетках растения *N. benthamiana* с помощью вектора pEff-GFP. (A) Визуализация GFP, синтезированного в листьях *N. benthamiana*. (B) 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*. (C) Схема экспрессии генов в растениях с использованием вектора pEff-GFP.

Таким образом, основными преимуществами 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, (4) наличие дополнительной кассеты экспрессии гена супрессора сайленсинга P24.

Для растений итоговый выход рекомбинантного белка зависит не только от эффективной экспрессии гена, но и от стабильности полученного белка. Протеазы, присутствующие в различных компартаментах растительных клеток, могут менять стабильность чужеродных белков. Для предотвращения нежелательного протеолиза *in vivo* были предложены подходы по перенаправлению синтезируемых белков в такие компарменты, как 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 сигнальный пептид. Расположение гистидинового тага может оказывать влияние на эффективность очистки целевого белка с помощью металл-аффинной хроматографии, поэтому были получены векторы, содержащие последовательность полигистидинового тага в 5' и 3' областях целевого гена.

На рисунке 3 представлена схема одного из таких векторов, pAeff, который позволяет получать белки с 8-гистидиновым тагом, расположенным на С-конце. В данном векторе присутствует кодирующая HDEL последовательность, адаптированная для экспрессии в *N. benthamiana* (CAT GAC GAG CTG). Последовательность 8 гистидинов отделена от HDEL гибким линкером GSS.

В данном векторе можно осуществлять клонирование с использованием уникальных 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*.

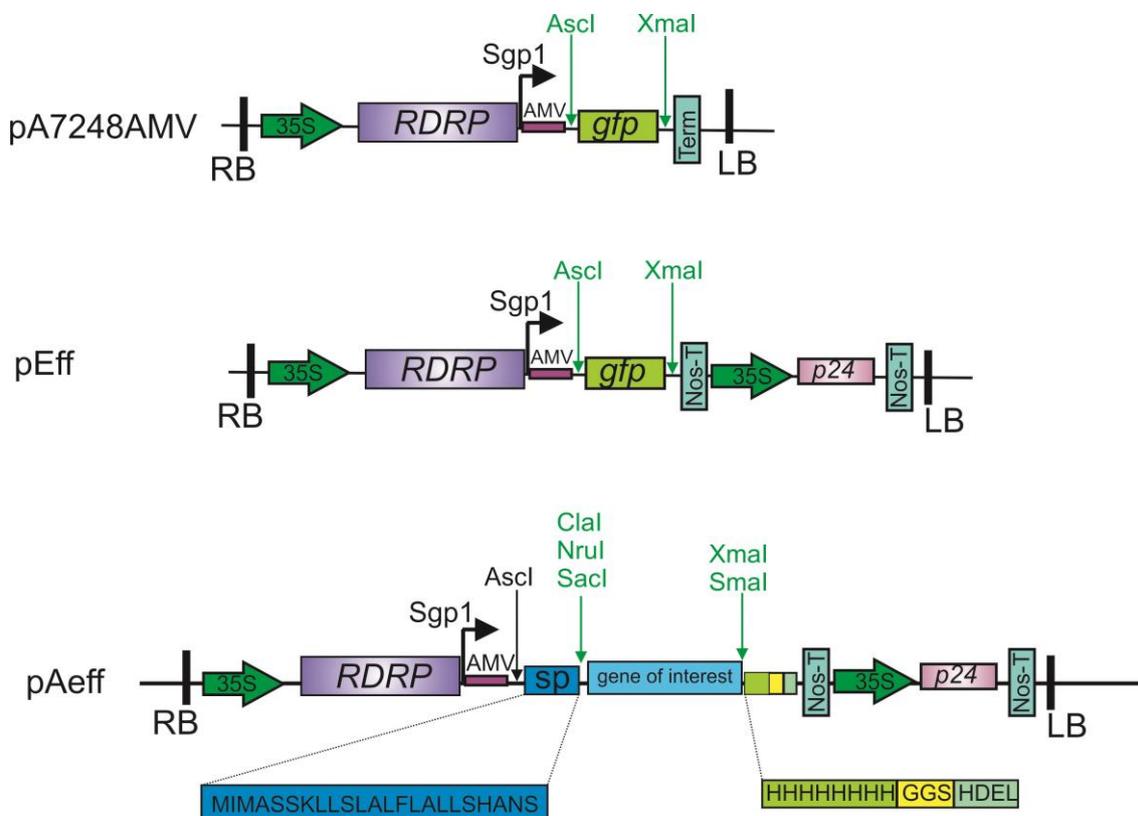


Рисунок 3. Схема основных экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля, полученных в данной работе.

## Методы введения экспрессионных векторов в растительные ткани

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

Помимо инфильтрации растений агробактериями с помощью шприца в данной работе мы использовали метод введения фитовирусных векторов в растительные клетки с помощью вакуумной агроинфильтрации. Схема вакуумной инфильтрации на примере вирусного вектора pEff-GFP, кодирующего ген зеленого флуоресцентного белка, представлена на рис. 4.

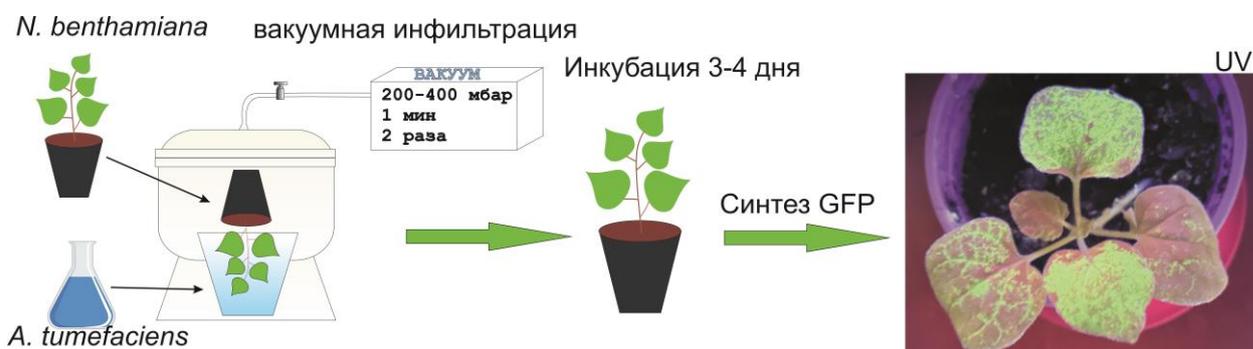


Рисунок 4. Схема вакуумной инфильтрации на примере вектора pEff-GFP.

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.

## 2. Разработка кандидатной растительной вакцины от вируса гриппа А на основе M2e пептида, присоединенного к ядерному антигену вируса гепатита В

Грипп представляет собой одно из наиболее распространенных вирусных заболеваний человека, защита от которого возможна с помощью вакцинации. Поверхностные антигены – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA) – являются мишенью 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 вакцины от гриппа необходимо обновлять практически ежегодно.

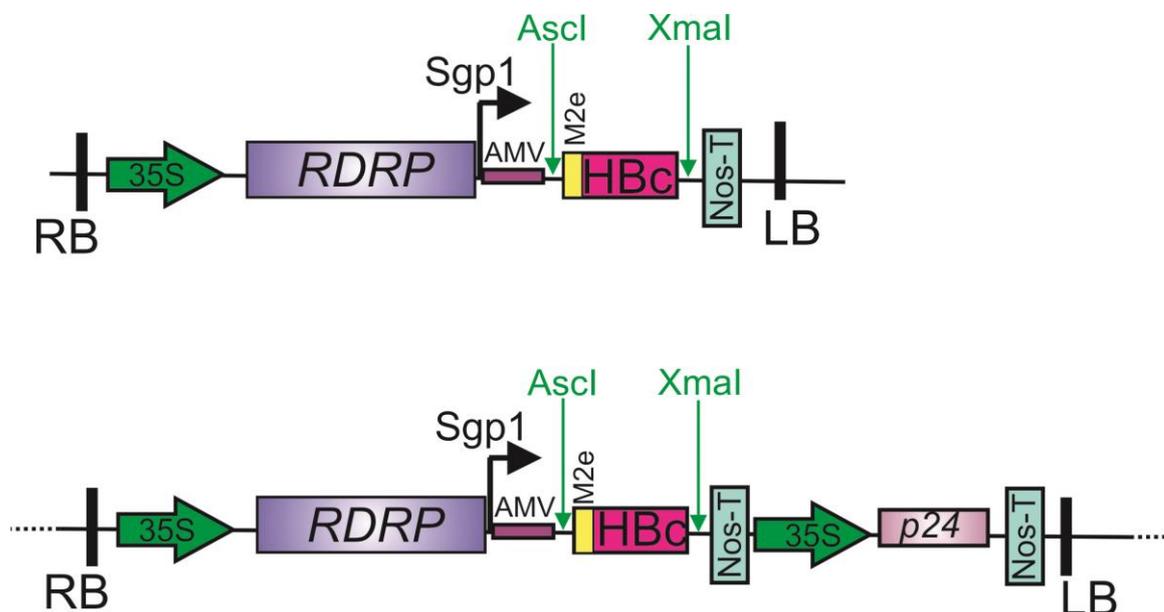
Поэтому актуальной задачей является создание универсальной вакцины. В состав такой вакцины должны входить высококонсервативные антигены вируса, которые присутствуют в различных штаммах вируса гриппа.

Основой для создания универсальной вакцины может быть внеклеточный (внешний) домен мембранного 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 ее повышения используются различные носители и адъюванты. Мы использовали в качестве носителя М2е пептида ядерный антиген вируса гепатита В (НВс). Экспрессия осуществлялась в *N. benthamiana*.

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

Последовательность М2ер «птичьего» штамма A/Duck/Potsdam1402-6/1986 (H5N2) была присоединена на N-конец НВс. Последовательность химерного гена М2ерНВс была оптимизирована для экспрессии в *N. benthamiana* и синтезирована *in vitro*.

Для экспрессии гибридного белка М2ерНВс использовали векторы рА7248АМV [Ravin *et al.*, 2012] и рEff [Mardanova *et al.*, 2017]. Синтетический ген клонировали в эти векторы, в результате были получены рекомбинантные векторы рА7248АМV-М2ерНВс и рEff-М2ерНВс (рис. 5).



**Рисунок 5.** Схема вирусных векторов рА7248АМV-М2ерНВс и рEff-М2ерНВс. Показана Т-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; НВс – ядерный антиген вируса гепатита В; М2е – внеклеточный домен М2 белка вируса гриппа А A/Duck/Potsdam1402-6/1986 (H5N2); LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК.

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

Полученный вектор pA7248AMV-M2epHBc переносили в *A. tumefaciens* GV3101 и вводили в *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации. Для подавления вирус индуцированного ген-сайленсинга одновременно листья растений коинфильтрировали агробактериями, содержащими вектор pBIN\_P19 – продуцент белка супрессора сайленсинга P19. Растения выращивали в течение 4–6 дней, затем собирали листья и выделяли белковые препараты.

Полученные белки анализировали методом вестерн блоттинга с использованием антител против M2e пептида и против HBc антигена (рис. 6). Было установлено, что белок M2epHBc эффективно экспрессируется в клетках растения, является растворимым. Выход целевого продукта составляет 1-2% от растворимой фракции белков.

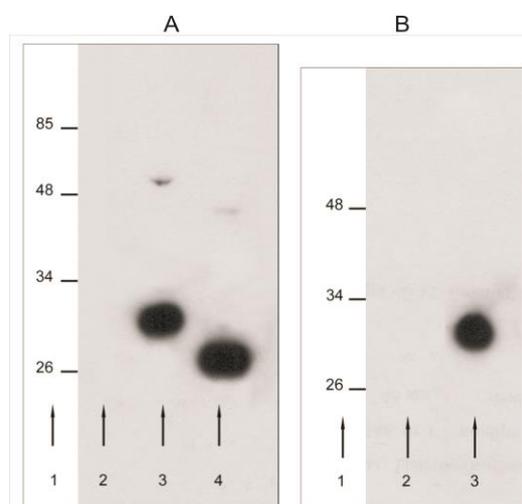
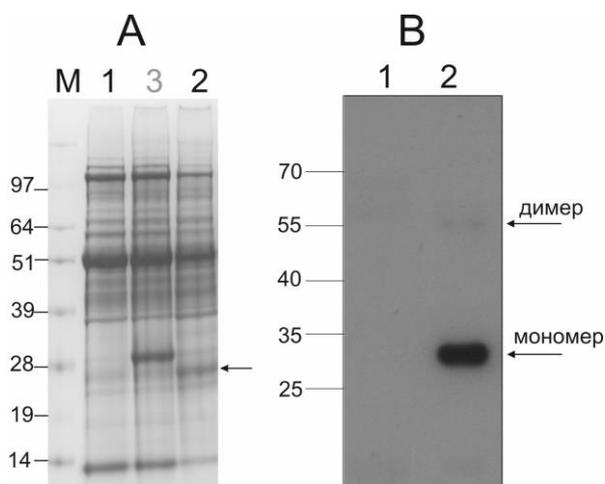


Рисунок 6. Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов рекомбинантного белка M2epHBc. Использовались моноклональные антитела на HBc белок (A) и на M2 (B). 1, маркер молекулярного веса (kDa), 2, растворимая фракция белков, выделенная из неинокулированных листьев, 3, растворимая фракция белков, выделенных из листьев, инокулированных вектором pA7248AMV-M2epHBc, 4, стандартный препарат HBc антигена (расчетный вес – 21 kDa). Расчетный вес M2epHBc составляет 24 kDa.

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

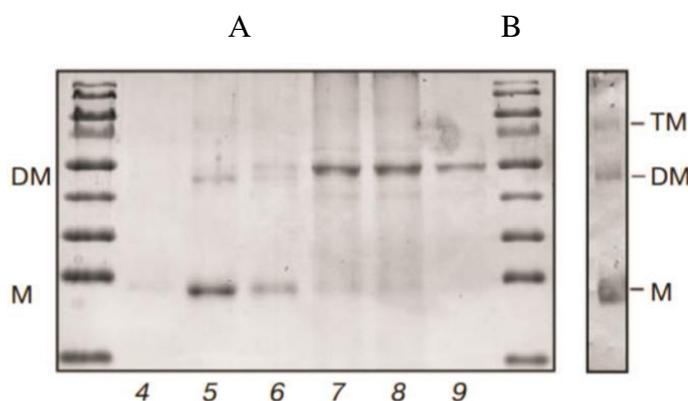
Вектор pEff-M2epHBc переносили в клетки *A. tumefaciens* LBA44404. Экспрессионный вектор вводили в клетки *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации. Образцы белка были выделены через 5 дней после инфильтрации и проанализированы с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга (рис. 7). Наши результаты показывают, 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-NT [Thuenemann *et al.*, 2013].



**Рисунок 7.** 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 неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфицированного рEff-M2ерНВс; 3, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфицированного рEff-GFP (контроль экспрессии).

#### *Очистка вирусоподобных M2ерНВс частиц.*

Вирусоподобные M2ерНВс частицы, образованные *in vivo* в растениях, выделяли из растительной ткани методом осаждения сульфатом аммония. Затем частицы очищали с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы и хлористого цезия. Белковый комплекс, образуемый M2ерНВс, по плавучей плотности отличается от растворимых растительных белков и при ультрацентрифугировании в основном присутствует в «тяжелых» фракциях градиента. Это указывает на то, что M2еНВс выделяется из растений - продуцентов в виде вирусоподобных частиц (рис. 8).

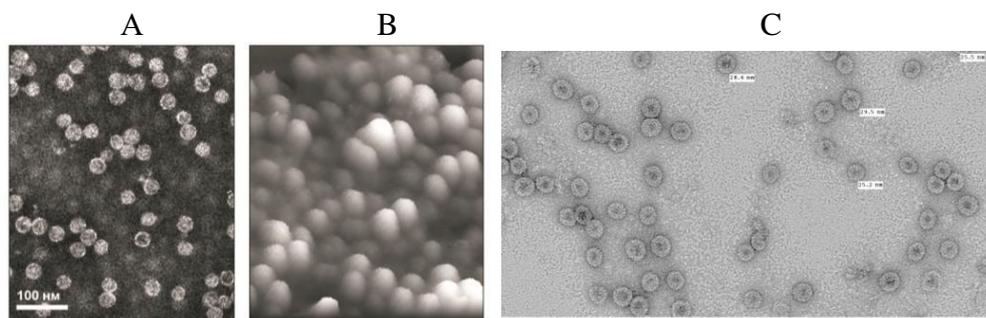


**Рисунок 8.** (A) SDS-PAGE белковых препаратов M2ерНВс, фракционированных ультрацентрифугированием. На дорожки нанесены препараты из различных фракций градиента плотности, от максимальной до минимальной (4–9). Указаны положения мономера (M) и димера (DM) M2ерНВс, полоса большей массы во фракциях 7–9 соответствует растительной рибулозбифосфаткарбоксилазе. (B) Вестерн блоттинг белкового препарата из фракции 5, детекция моноклональными антителами на M2е пептид. Указаны положения мономера (M), димера (DM) и тримера (TM) M2ерНВс.

#### *Структурная характеристика вирусоподобных M2ерНВс частиц.*

Структуру образованных в растениях вирусоподобных частиц M2ерНВс анализировали с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии. На рисунке 9

представлены результаты анализа частиц, полученных в экспериментах с использованием векторов рА7248АМV-М2ерНВс и рEff-М2ерНВс, соответственно. Анализ подтвердил факт сборки гибридных белков М2ерНВс в наноразмерные вирусоподобные частицы сферической формы диаметром ~30 нм.



**Рисунок 9.** Анализ структуры М2ерНВс частиц с помощью электронной (А) и атомно-силовой (В) микроскопии при экспрессии с использованием вектора рА7248АМV-М2ерНВс. Использовали просвечивающий электронный микроскоп JEM 1011 (JEOL, Япония), для атомно-силовой микроскопии использовали микроскоп INTEGRA (NT-MDT). (С) Анализ структуры М2ерНВс частиц при экспрессии с использованием вектора рEff-М2ерНВс. Использовали просвечивающий электронный микроскоп FEI Tecnai 20.

#### *Иммуногенность и протективное действие полученных в растениях вирусоподобных М2ерНВс частиц.*

Для оценки иммуногенности и протективного действия белка М2ерНВс в качестве кандидаткой вакцины против вируса гриппа А в НИИ Гриппа Минздрава РФ были проведены эксперименты на лабораторных животных.

Valb/c мыши были иммунизированы препаратами М2ерНВс частиц. Мышей иммунизировали внутривенно трижды с интервалом в две недели с применением для первого введения вакцины адьюванта Sigma system Adjuvant («Sigma»), а для двух последующих иммунизаций – неполного адьюванта Фрейнда («Sigma»). Доза вводимого препарата составляла 20 мкг при первой иммунизации, 50 мкг – при последующих.

В результате было показано, что после трехкратной иммунизации в высоких титрах образуются сывороточные антитела изотипа IgG, связывающиеся как с синтетическим пептидом, последовательность которого соответствовала использованному для иммунизации М2ер, так и с пептидом, последовательность которого соответствовала М2е гетерологичного штамма вируса гриппа А.

Для оценки протективного действия вакцины мышей опытной и контрольной групп заражали адаптированным к мышам штаммом вируса гриппа А/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 массы тела и выживаемость мышей после заражения (рис. 10).

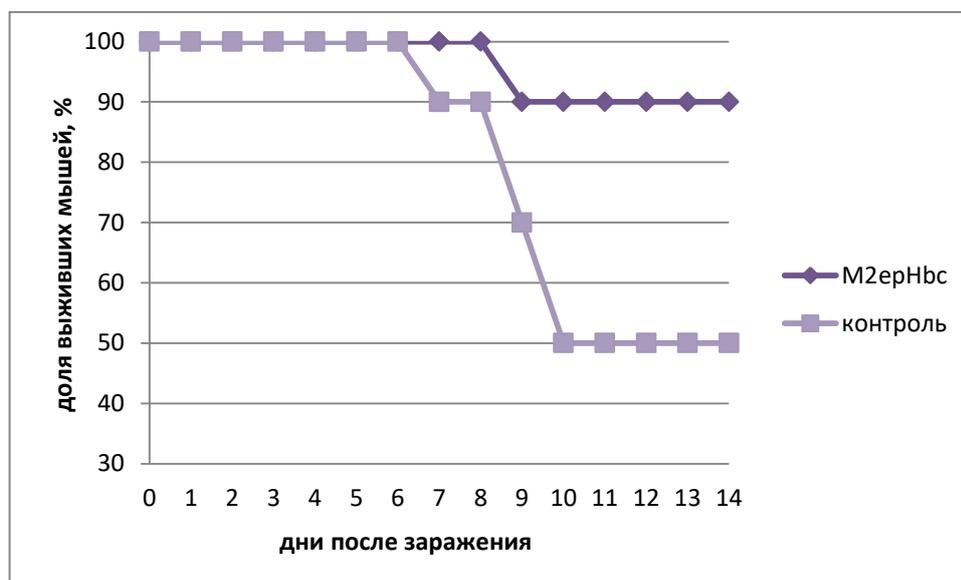


Рисунок 10. Протективное действие препарата частиц M2epHbc. Динамика гибели мышей после заражения 1 LD50 вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005.

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 M2epHbc. В контрольной группе мышей при этих условиях заражения выжило лишь 50% животных.

#### Заключение

Таким образом, гибридный белок M2epHbc эффективно синтезируется в *N. benthamiana*. Эффективность экспрессии существенно зависит от используемого экспрессионного вектора. Так при экспрессии с использованием вектора pA7248AMV-M2epHbc эффективность составила 1 – 2 % от суммарного растворимого белка, в то время как при использовании улучшенного вектора pEff-M2epHbc эффективность была уже 5 – 10%. Вне зависимости от системы экспрессии M2epHbc образует вирусоподобные частицы сферической формы размером ~ 30 нм. Иммунизация мышей M2epHbc частицами вызывает эффективный иммунный ответ против M2e и обеспечивает формирование протективного иммунитета против летальной гриппозной инфекции.

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

В этой части работы в качестве адъюванта-носителя М2е пептида использован флагеллин бактерии *Salmonella typhimurium*. Этот белок обладает выраженными адъювантными свойствами, так как является лигандом толл-подобного рецептора 5 (TLR5) и через адаптерный белок MyD88 активирует клетки CD4<sup>+</sup> и дальнейшую индукцию синтеза специфических иммуноглобулинов. Флагеллин является мукозальным адъювантом, 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 *S. typhimurium* с 4 копиями М2е белка вируса гриппа А.

Четыре копии М2е пептида гриппа А были включены на С-конец флагеллина. 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 линкерами. Ген, кодирующий гибридный белок, клонировали в векторе рА7248АМV. В результате был получен вектор рА7248АМV-Flg-4М (рис. 11).

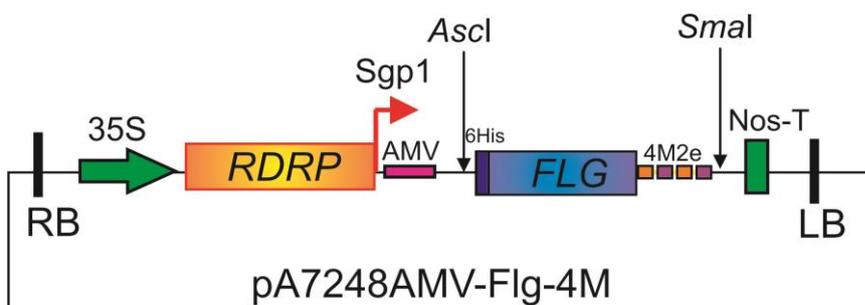
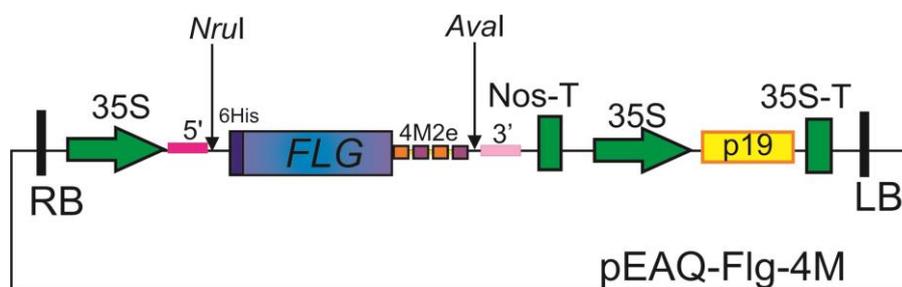


Рисунок 11. Схема вирусного вектора рА7248АМV-Flg-4М. Показана Т-ДНК область бинарного вектора

Параллельно последовательность гена Flg-4М2е была клонирована в векторе рЕАQ-НТ [Sainsbury *et al.*, 2009], основанном на геноме вируса мозаики коровьего гороха (cowpea mosaic virus, СРМV). В отличие от рА7248АМV, вектор рЕАQ-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. Данный вектор дополнительно кодирует супрессор сайленсинга Р19 (рис. 12).



**Рисунок 12.** Схема вектора pEAQ-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 агроинфильтрации. Листья *N. benthamiana* инфильтрировали равными количествами агробактерий, содержащими рекомбинантные векторы.

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. 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 M2e. В качестве отрицательного контроля использовали неинфильтрованные листья растения *N. benthamiana*.

Для каждого дня результаты вестерн блоттинга анализов суммировали по трем листьям. Для этого определяли интенсивность полос, соответствующих белку Flg-4M. В качестве референсной использовали полосу, соответствующую стандартному препарату Flg-4M. На рисунке 14 представлены суммарные результаты вестерн блоттинга.

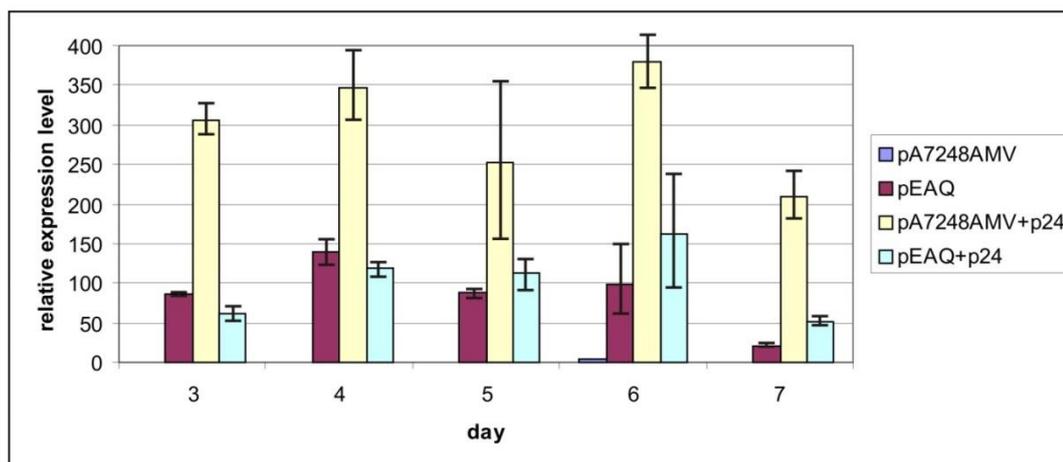


Рисунок 13. Динамика экспрессии белка Flg-4M в растениях. Приведена диаграмма, отображающая суммарные результаты вестерн блоттингов белковых препаратов с 3 по 7 день после агроинfiltrации растений исследуемыми векторами.

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

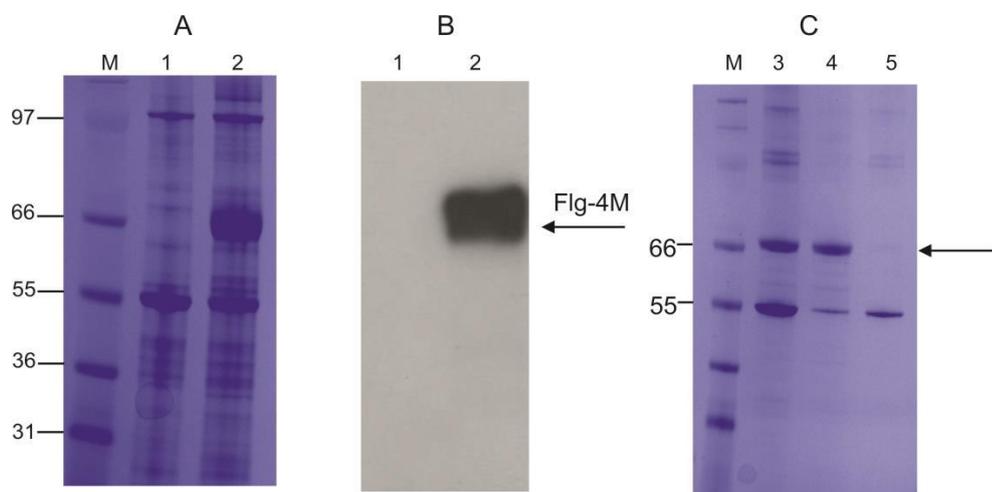
В случае вектора pEAQ-NT\_Flg-4M уровень экспрессии целевого гена в независимости от наличия P24 был в несколько раз ниже, чем для пары pA7248AMV-Flg-4M и продуцента P24.

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

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

Экспрессионные векторы переносили в растения с помощью агроинfiltrации. Растения выращивали в течение четырех дней, после чего из зон агроинfiltrации выделяли препараты белков. Полученные белковые препараты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга анализа с использованием антител против M2e пептида (рис 14). 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. Очистку рекомбинантного белка Flg-4M проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Полученные белки диализовали против буфера PBS. Диализованный препарат центрифугировали при 100 000 g для удаления агрегатов Rubisco (рис. 14).



**Рисунок 14.** SDS-PAGE (A) и Вестерн блоттинг анализ (B) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов через 4 суток после заражения. М – маркер молекулярного веса (kDa); 1 – препарат растворимых белков из неинкулированных листьев *N. benthamiana*; 2 – препарат растворимых белков из листьев *N. benthamiana*, инокулированных рA7248AMV-Flg-4M и продукт P24. (C) SDS-PAGE анализ очистки препарата Flg-4M. М – маркер молекулярного веса (кДа); 3 – очищенный диализованный препарат Flg-4M до центрифугирования; 4 – очищенный препарат Flg-4M после ультрацентрифугирования; 5 – осадок после ультрацентрифугирования.

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

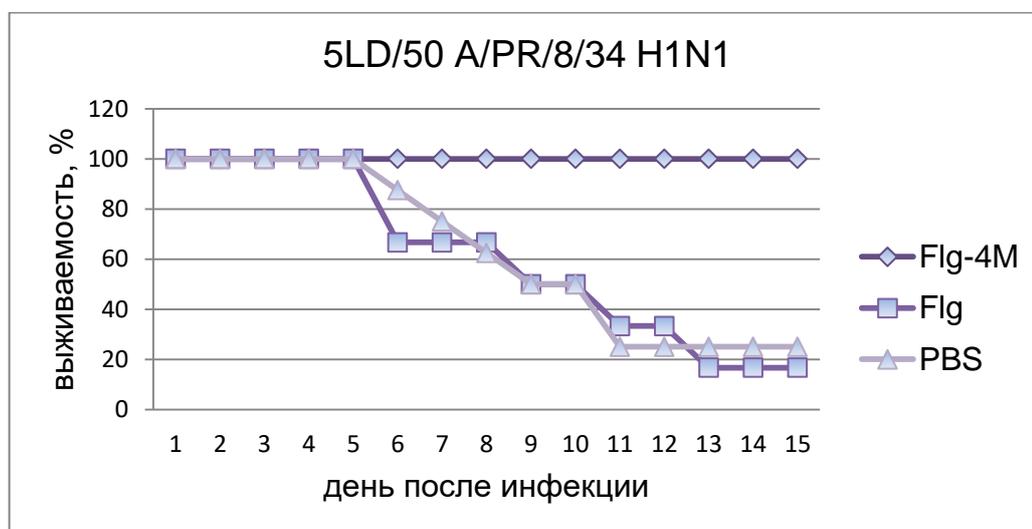
#### *Иммуногенность и протективное действие полученного в растениях белка Flg-4M.*

Для оценки иммуногенности и протективного действия рекомбинантного белка Balb/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 мкг белка интраназально трижды с двухнедельными интервалами без дополнительных адъювантов.

В сыворотках иммунизированных мышей наблюдались высокие титры антител против M2e, уровень которых был даже выше, чем антител против флагеллина. Уровень антител против M2e в бронхоальвеолярных лаважах (БАЛ) также был достоверно выше, чем в контрольных группах.

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 5LD<sub>50</sub>. 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. 15). Снижение массы тела мышей, иммунизированных Flg-4M, было менее выраженным по сравнению с выжившими контрольными животными.



**Рисунок 15.** Динамика гибели мышей, иммунизированных рекомбинантными белками Flg-4M, Flg после заражения 5 LD<sub>50</sub> вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Достоверное отличие между группами Flg-4M и контрольной группой ( $p \leq 0,05$  Montel-Cox 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 1).

**Таблица 1.** Вирусовыделение из легких на 6 сутки после заражения мышей A/PR/8/34 H1N1 в дозе 5LD<sub>50</sub>

Препарат	Репродукция в легких, lg ТЦД <sub>50</sub>
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, экспрессирован химерный белок, содержащий флагеллин *S. typhimurium*, соединенный с четырьмя тандемными копиями M2e пептида вируса гриппа А в растениях. 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 без дополнительных адъювантов 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.

### **3. 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 вариабелен, его вторая субъединица (НА2), образующая домен стебля, относительно консервативна [Krystal *et al.*, 1982], особенно в пределах конкретной филогенетической группы белков НА (первая группа - Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13 и Н16, вторая группа - 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]. 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 Flg4M2eHA2-1 содержал две копии M2e пептида вируса гриппа человека (консенсусная последовательность, M2eh), две копии M2e штамма А/Н1N1pdm09, вызвавшего пандемию 2009 г. (M2es), присоединенные к С-концу флагеллина *S. typhimurium*, а также консенсусную последовательность консервативного

региона второй субъединицы гемагглютинаина вируса гриппа А (альфа спираль, с 76 по 130 aa), 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. 16).

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

Для экспрессии гибридного белка использовали вектор pEff. (рис. 16).



Рисунок 16. Структура вектора pEff\_Flg4M2eHA2-1.

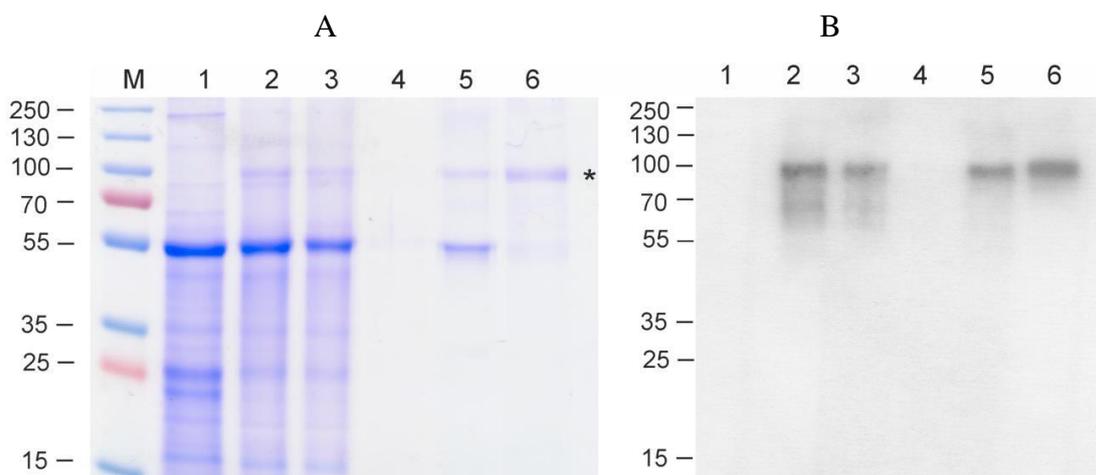
6his, последовательность 6 остатков гистидина; Flg, флагеллин *S. typhimurium*; HA2, фрагмент гемагглютинаина (76 – 130 aa); 4M2e, последовательность четырех тандемных копий пептида M2e вируса гриппа А (M2eh-M2es-M2eh-M2es).

*Экспрессия гибридного белка Flg4M2eHA2-1 в N. benthamiana.*

Анализ экспрессии рекомбинантного белка в растениях показал, что белок практически нерастворим и, следовательно, очистку препарата следует проводить в денатурирующих условиях.

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 для удаления агрегатов RuBisCO.

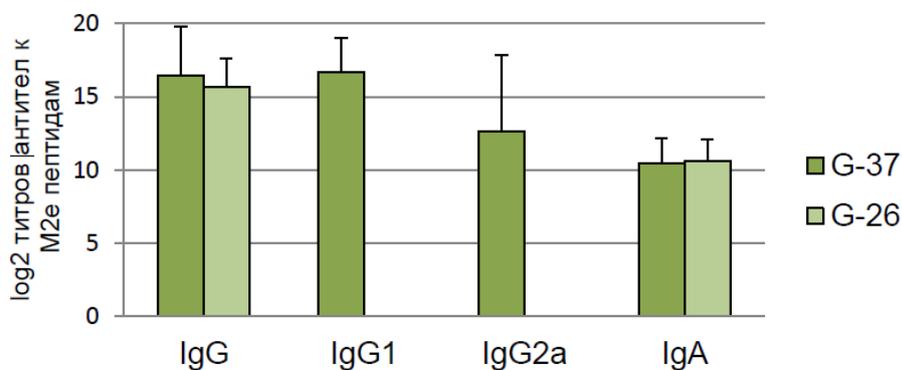
Белковые препараты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга. Данные, представленные на рис. 17, свидетельствуют о том, что белок Flg4M2eHA2-1 эффективно экспрессируется в *N. benthamiana* на уровне 300 мкг/г биомассы листа. После выделения и очистки финальный выход составил 60 мкг/г растительной биомассы. После очистки было наработано около 5 мг препарата с чистотой около 90%. Полученный препарат использовали в экспериментах на лабораторных животных.



**Рисунок 17.** SDS-PAGE (А) и вестерн блоттинг (В) белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрованного листа; 2, препарат суммарного растительного белка, выделенного из листа, инфильтрованного рEff\_Flg4M2eHA2-1. Очистка белка Flg4M2eHA2-1 на колонке Ni-NTA: 3, несвязавшаяся 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 были проведены эксперименты на лабораторных животных. BALB/c мыши были иммунизированы препаратом Flg4M2eHA2-1 и «пустым» флагеллином в качестве контроля. Мышей иммунизировали интраназально трижды с интервалом две недели в дозе 10 мкг белка без дополнительных адъювантов. Было обнаружено, что иммунизация препаратом Flg4M2eHA2-1 индуцирует выработку высоких титров IgG в сыворотке у мышей, преимущественно субтипа IgG1 (рис. 18). Индуцированные антитела IgG и IgA почти одинаково эффективно связываются с пептидами G-37 и G-26, последовательности которых соответствуют M2eh и M2es, соответственно.



**Рисунок 18.** 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. Значимые различия ( $p < 0,05$ ) от контрольных групп отмечены звездочкой (\*).

Для детекции IgG в секрете слизистых определяли титры M2e специфических антител в БАЛ. В БАЛ мышей, иммунизированных препаратом Flg4M2eHA2-1, наблюдались достоверно более высокие титры M2e-специфических IgG антител, чем в БАЛ мышей, которым вводили контрольный флагеллин или PBS (рис. 19).

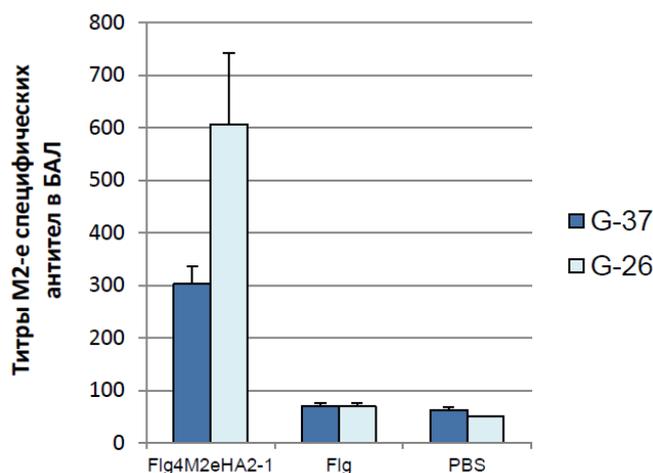
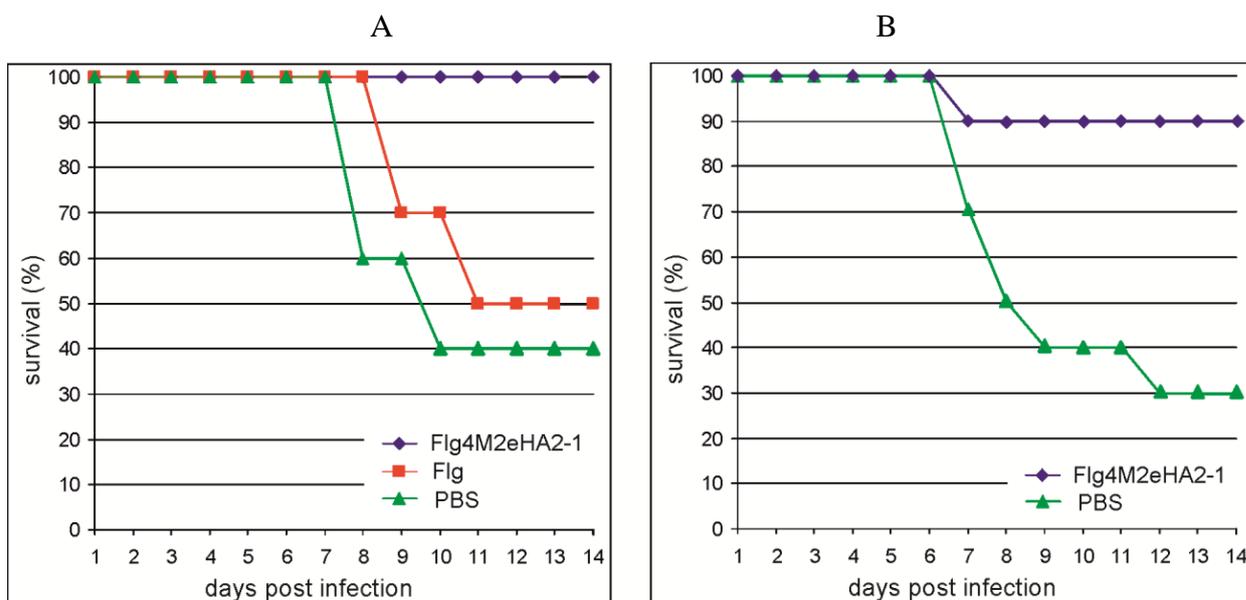


Рисунок 19. Титры антител IgG к синтетическому M2e пептиду G-37 и G-26 в БАЛ иммунизированных мышей после третьей иммунизации. Результаты представлены в виде среднего титра  $\pm$  стандартное отклонение для каждой группы. Различия между титрами специфичных к M2e антител, распознающих пептиды G-26 и G-37, не были статистически значимыми.

Мы обнаружили, что иммунизация мышей препаратом Flg4M2eHA2-1 индуцирует довольно низкие титры HA-специфических IgG, но отличия в титрах антител от контрольных групп (Flg и PBS) 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 рис. 20, все мыши, иммунизированные Flg4M2eHA2-1, пережили заражение дозой 2 LD<sub>50</sub>, в то время как выживаемость среди контрольных групп была значительно ниже. Во втором эксперименте 90% мышей, иммунизированных Flg4M2eHA2-1, пережили заражение дозой 5 LD<sub>50</sub>, 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 5LD<sub>50</sub>. Титр вируса в легких зараженных иммунизированных мышей составлял 3,2 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>, а в контрольной группе (PBS) - 4,3 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>, отличие было статистически значимым ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 20.** Протективное действие белка Flg4M2eHA2-1. Мышей заражали вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 2 LD<sub>50</sub> (A) или 5 LD<sub>50</sub> (B). Показана динамика гибели мышей в течение 14 дней после заражения.

### Заключение

Таким образом, экспрессирован гибридный белок, содержащий флагеллин с присоединенным к нему фрагментом гемагглютинаина и четырьмя копиями M2e пептида вируса гриппа А, в *N. benthamiana*. Использование вектора rEff позволило достичь уровня экспрессии до 300 мкг/г 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. 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.

Инфекция, вызванная вирусом гепатита Е (HEV) 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 Е является актуальной задачей. В настоящее время в основе разработки рекомбинантных вакцин от гепатита Е 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 нашей 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 P-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 экспрессии HEV110-610 капсида и капсида с M2e пептидом также использовали рEff. Для этого нами были получены экспрессионные векторы рEff-HEV110-610, M2 HEV110-610. Схема полученных векторов представлена на рис. 21.

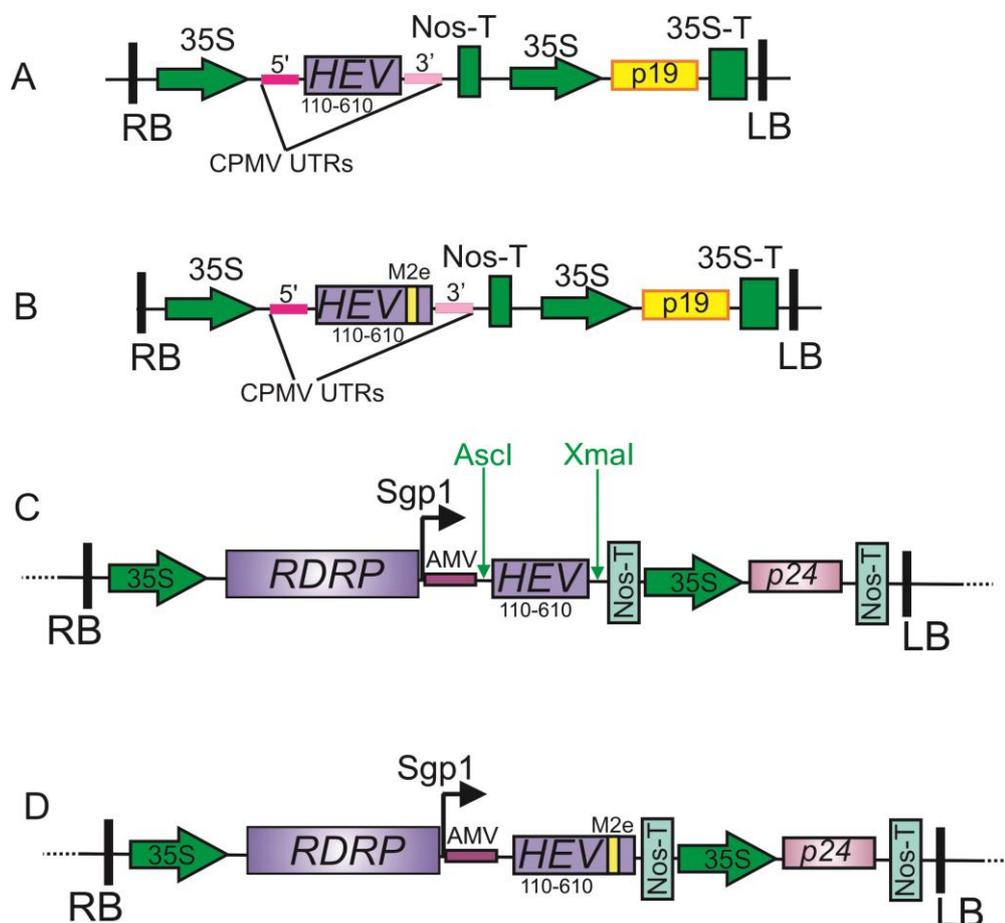


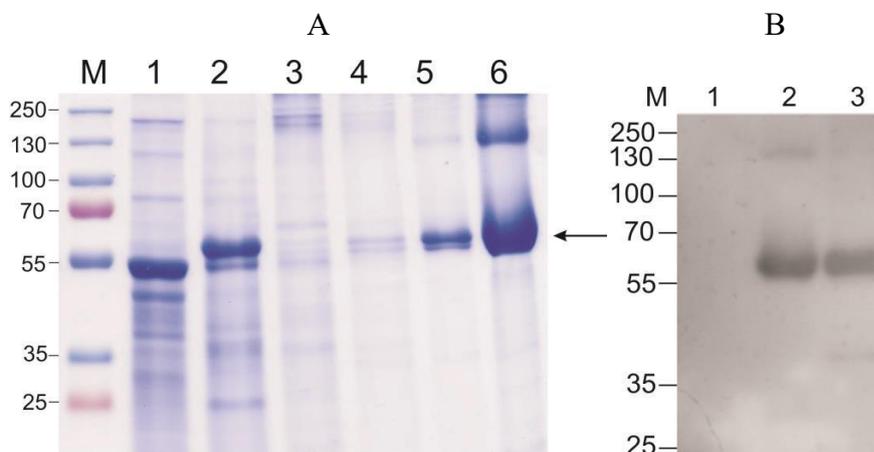
Рисунок 21. Структура экспрессионных векторов рEAQ-HEV110-610 (А), рEAQ-M2 HEV110-610 (В), рEff-HEV110-610 (С), и рEff-M2 HEV110-610 (D).

На первом этапе мы сравнивали эффективность синтеза белков М2 HEV110-610 и HEV110-610 с использованием векторов рEff и рEAQ. Суммируя результаты экспрессии по нескольким листьям, мы сделали вывод, что рEff обеспечивает более высокий уровень экспрессии для исследуемых белков по сравнению с рEAQ. Поэтому в последующих экспериментах по экспрессии гибридных белков использовали вектор рEff.

*Экспрессия в растениях капсидного белка HEV110-610, его выделение и очистка.*

Белок HEV110-610 эффективно экспрессировался в растениях при использовании вектора рEff\_HEV110-610 в растворимой фракции. Эффективность экспрессии составила ~ 10% от суммарного растворимого белка, что соответствует ~ 300 мкг с 1 г растительной биомассы.

Для возможности выделения из растений-продуцентов белка HEV110-610 с помощью металл-аффинной хроматографии в 3'-конец соответствующего гена вводили последовательность, кодирующую гексагистидиновый таг. Очистку белка HEV110-610<sub>his</sub> проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в нативных условиях. Очищенный белок анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга (рис. 22).



**Рисунок 22.** Экспрессия и очистка белка HEV110-610<sub>his</sub>.

(А) 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 рEff\_HEV110-610<sub>his</sub>; 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<sub>his</sub>.

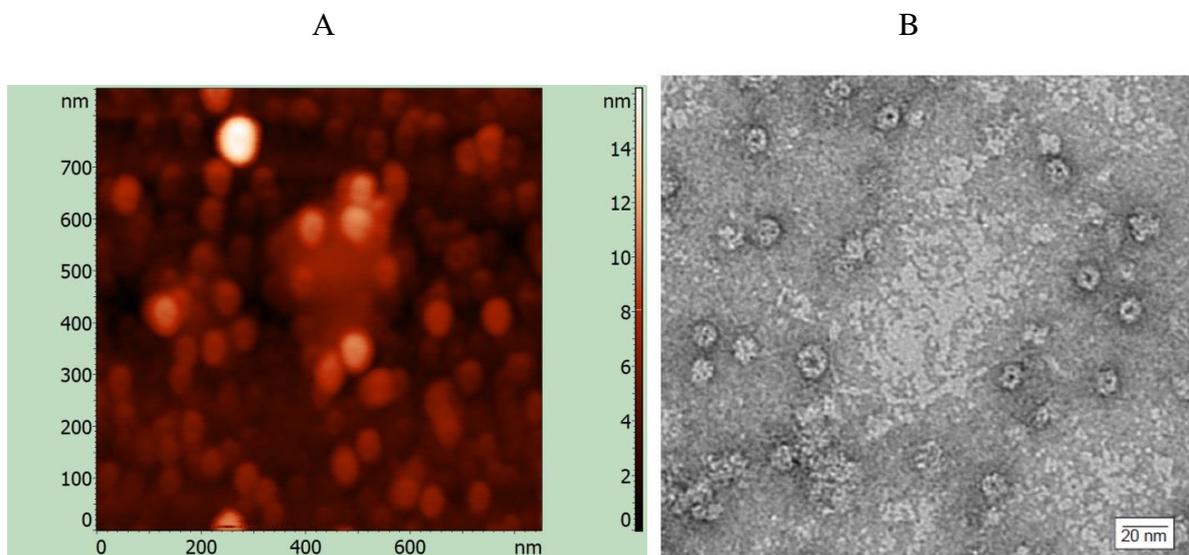
(В) Вестерн блоттинг белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного растворимого растительного белка, выделенного из листа, инфильтрированного рEff\_HEV110-610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

В результате препарат HEV110-610<sub>his</sub> был наработан в растениях в количестве около 10 мг. Конечный выход белка HEV110-610<sub>his</sub> составил 150 – 200 мкг с 1 г растительной биомассы, чистота - более 95%.

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

Формирование вирусоподобных частиц белком HEV110-610<sub>his</sub> в растениях анализировали методом динамического светорассеяния, а также атомно-силовой и электронной микроскопии. Образованные белком высокомолекулярные структуры анализировали с помощью Malvern Zetasizer Nano S90. Были обнаружены частицы размером 11 – 17 нм, а также агрегаты большего размера.

Структуру частиц также исследовали методом атомно-силовой микроскопии. Наблюдала образование частиц размером 11 – 16 нм (рис. 23). Вирусоподобные частицы также исследовали на просвечивающем электронном микроскопе. Были обнаружены частицы размером 12 – 26 нм. Частицы имеют сферическую форму и полые внутри.



**Рисунок 23.** (А) Атомно-силовая микроскопия частиц, образованных HEV110-610\_his в растениях. (В) 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 Е были проведены эксперименты на животных. Balb/c мыши были иммунизированы препаратом HEV110-610\_his и PBS в качестве контроля. Мышей иммунизировали внутримышечно трижды с интервалом две недели в дозе 50 мкг белка с Деринатом в качестве адьюванта. Образцы крови выделяли через две недели после третьей иммунизации. Сыворотки анализировали с помощью ИФА (таблица 2).

Таблица 2. Титры IgG антител к HEV в сыворотке мышей, иммунизированных препаратом HEV110-610\_his через две недели после третьей иммунизации

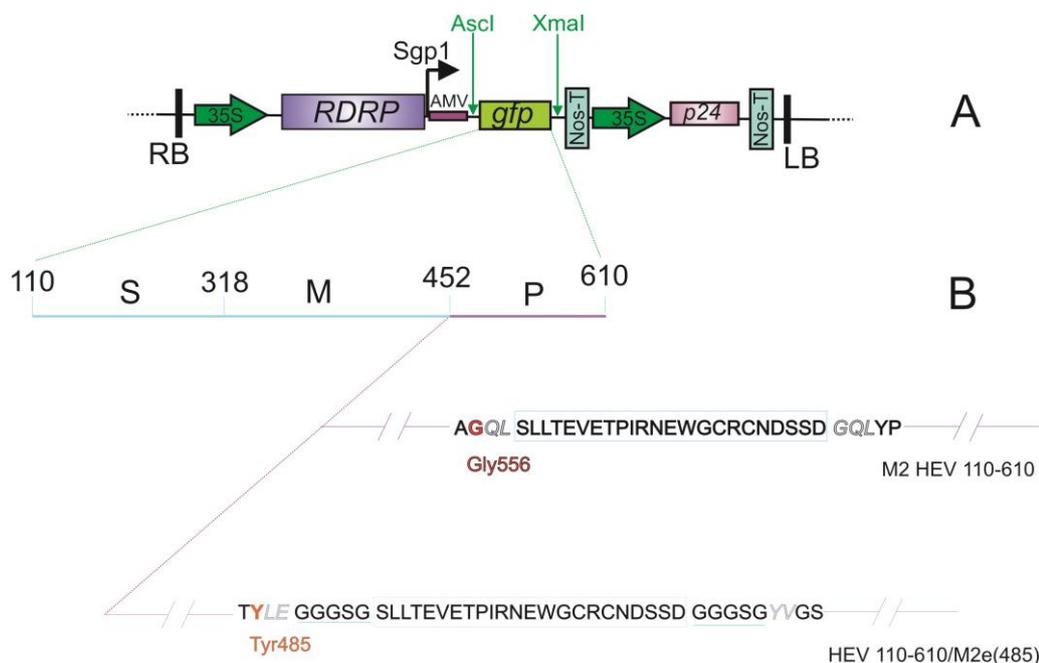
Группа/препарат	№ мыши	титр антител
HEV110-610_his	1	102400
	2	204800
	3	204800
	4	25600
	5	204800
среднее геометрическое		117626 ± 6311
PBS	1	800
	2	800
	3	800
	4	400
среднее геометрическое		673 ± 21

Таким образом, белок HEV110-610\_his синтезируется в растениях *N. benthamiana* на уровне ~ 300 мкг с 1 г биомассы листа, является растворимым, выделяется с помощью металл-аффинной хроматографии с конечным выходом 150 – 200 мкг/г. 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 основы кандидатной вакцины от вируса гепатита E, а также для создания диагностикума.

*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).

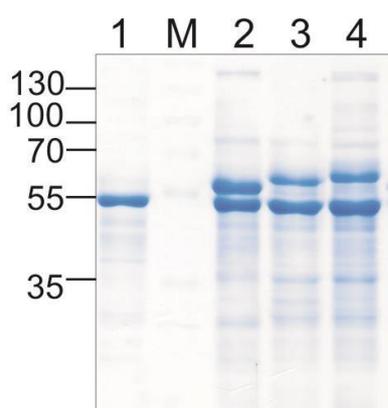
Было исследовано два варианта вставки M2e пептида. В первом варианте последовательность M2e была включена в капсидный белок вируса гепатита E после Gly556. Во втором варианте последовательность M2e, фланкированная с двух сторон гибкими линкерами GGGSG для лучшего фолдинга белков, была включена после Tyr485 (рис. 24). 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 24.** 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 М2е пептид вируса гриппа А, в N. benthamiana.*

Для экспрессии гибридных белков в *N. benthamiana* соответствующие векторы переносили в *A. tumefaciens*. Через 4 суток после заражения из зон агроинфильтрации выделяли препараты растворимых белков и анализировали их с помощью SDS-PAGE (рис. 25).

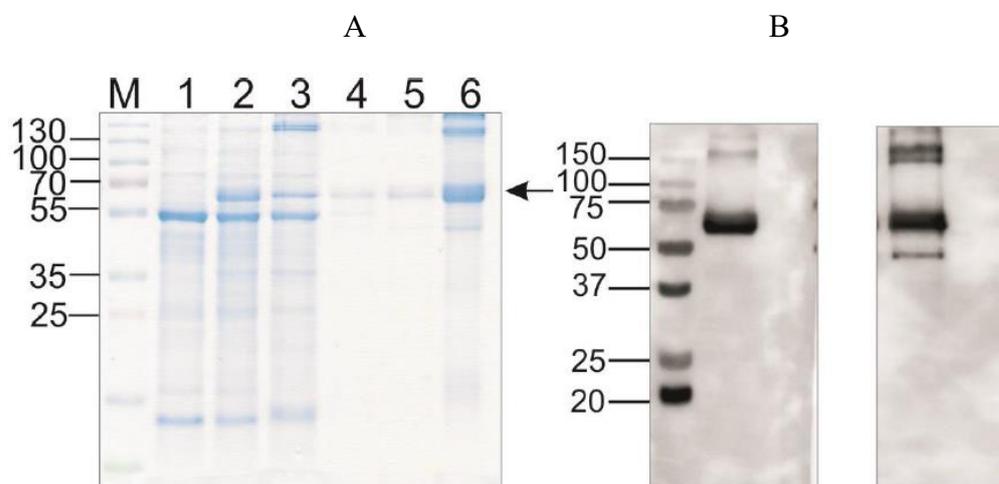


**Рисунок 25.** SDS-PAGE белковых препаратов, выделенных из растений *N. benthamiana*. М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат растворимого белка, выделенного из неинфильтрованного листа; 2, 5, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфильтрованного рEff\_HEV110-610; 3, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфильтрованного рEff-M2 HEV110–610; 4, препарат растворимого белка, выделенного из листа, инфильтрованного рEff\_HEV 110-610/M2e(485).

По результатам SDS-PAGE можно сделать вывод, что все три белка синтезируются в растениях *N. benthamiana* на высоком уровне и находятся в растворимой фракции. Уровень экспрессии составлял около 10% от растворимого белка, что соответствовало до 300 мкг с 1 г растительной биомассы.

*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 26 проиллюстрирована очистка белка HEV110-610/M2e(485). Наряду с мономером после очистки наблюдались полосы более высокого молекулярного веса (дор. 6 на рис. 26). Дополнительно анализ очищенных белков проводили с помощью вестерн блоттинга с антителами против HEV и M2e пептида (рис. 26). 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 26.** (А) 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 рEff\_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). (В) Вестерн блоттинг препаратов рекомбинантного белка HEV110-610/M2e(485), выделенных из растений *N. benthamiana*. (дорожка 1). Использованы антитела к M2e (слева) и к HEV (справа).

Белок M2 HEV110-610 выделяли аналогичным образом. Очищенный препарат анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн блоттинга с антителами против M2e пептида (рис. 27).

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

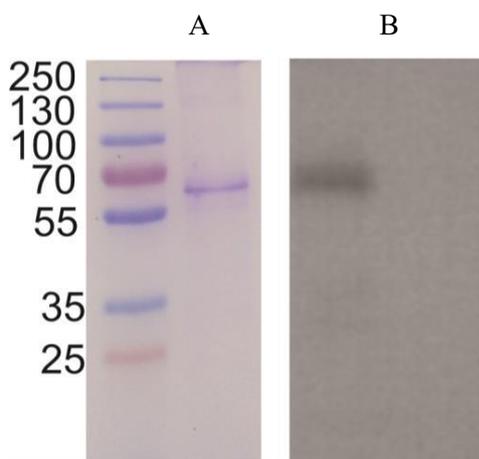


Рисунок 27. SDS-PAGE (A) и вестерн блоттинг анализ (B) рекомбинантного белка M2 HEV110-610, выделенного из *N. benthamiana*.

*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.

Структуру M2 HEV110-610 частиц также анализировали методами атомно-силовой микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии (рис. 28). По данным атомно-силовой микроскопии частицы имеют размер 16 – 20 нм. С помощью электронной микроскопии размер частиц оценивается в  $39 \pm 9$  нм. Частицы M2 HEV110-610 имеют сферическую форму и являются полыми внутри.

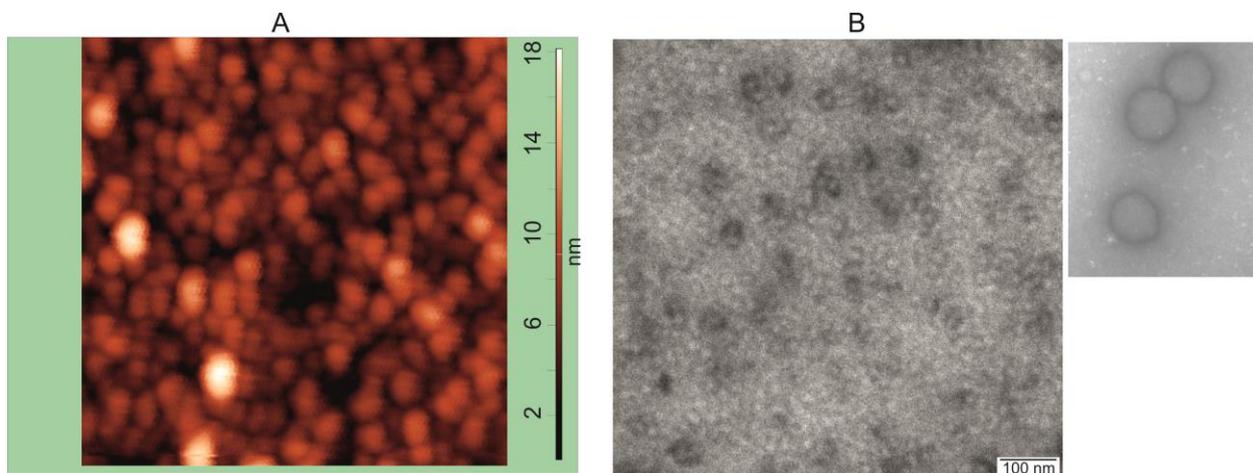


Рисунок 28. (A) Атомно-силовая микроскопия частиц, образованных M2 HEV110-610. Размер частиц: 16 – 20 нм. (B) Электронная микроскопия частиц, образованных M2 HEV110-610. Размер частиц:  $39 \pm 9$  нм.

Структуру наночастиц, образованных гибридным капсидным белком HEV110-610/M2e(485), анализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Были обнаружены частицы размером 40-50 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 животных.

Balb/c мыши 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 мкг белка с Деринатом в качестве адьюванта. Было проведено два независимых эксперимента: в первом участвовали препараты HEV110-610, M2 HEV110-610 и PBS (таблица 3); во втором эксперименте – HEV110-610/M2e(485) и PBS (таблица 4).

Таблица 3. 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,  $p < 0.01$ .

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 М2е был статистически выше контроля в случае белка HEV 110-610/М2е(485) ( $p < 0.01$ ), а для белка М2 HEV 110–610 наблюдалось лишь незначительное отличие уровня титра антител от контроля.

Таблица 4. Эксперимент № 2. Титры IgG антител к М2е (синтетически пептид G-37) и HEV в сыворотке мышей, иммунизированных препаратом HEV110-610/М2е(485) после второй и третьей иммунизации

№	Препарат/мышь		IgG		
			G37		HEV После 3-й иммунизации
			После 2-й иммунизации	После 3-й иммунизации	
1	HEV110- 610/М2е(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	<b>1</b>	800	1600	1600
		<b>2</b>	400	400	800
		<b>3</b>	-	400	1600
		<b>4</b>	-	800	400
		<b>5</b>	-	400	400
		<b>СГТ</b>	<b>565,69</b>	<b>606,29</b>	<b>800</b>

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

*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.

Последовательность RBD белка S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 с 319 по 524 аа, фланкированная с двух сторон гибкими линкерами GGGSG для лучшего фолдинга белков, была включена в HEV110-610 после Туг485.

Последовательность, кодирующая гибридный белок HEV/RBD была клонирована в экспрессионных векторах pEff и pAeff (рис. 29). 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.

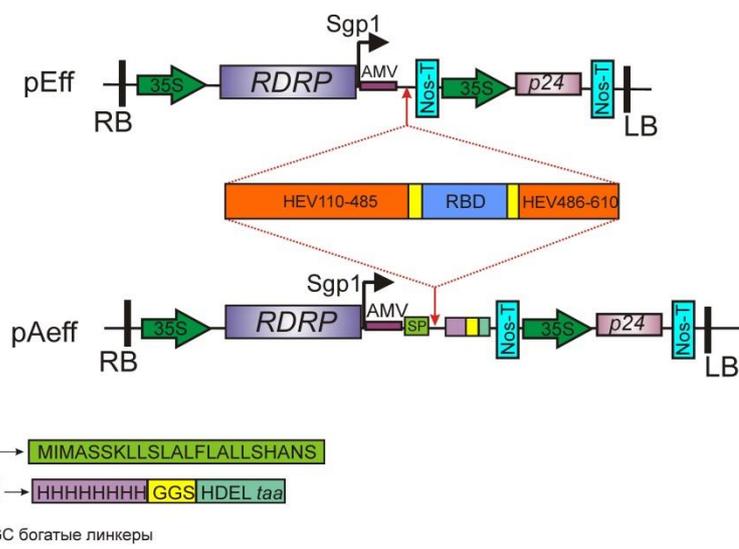


Рисунок 29. Структура экспрессионных векторов. Показаны области Т-ДНК рекомбинантных бинарных векторов: HEV, ORF2 вируса гепатита E; RBD, последовательность RBD SARS-CoV-2 с 319 по 524 аа, соответствующая штамму Wuhan-Hu-1; SP, сигнальный пептид.

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.

Очистку рекомбинантного белка проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в нативных условиях (рис. 30). Финальный выход препарата HEV/RBD, выделенного из растворимой фракции растительных белков, составил 20 мкг на 1 грамм листьев.

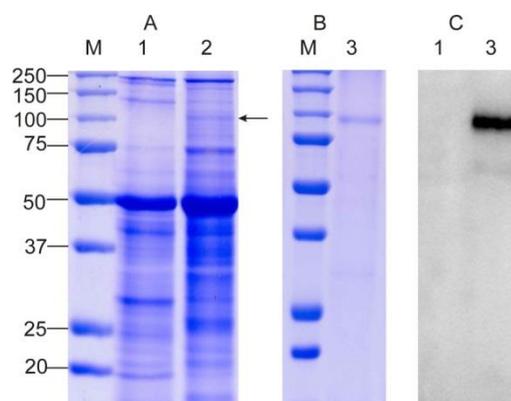
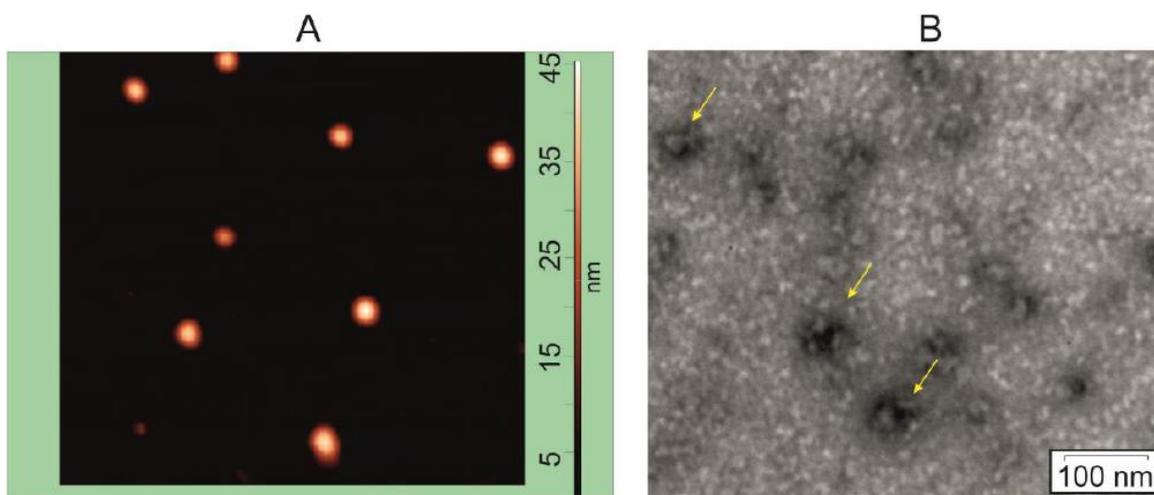


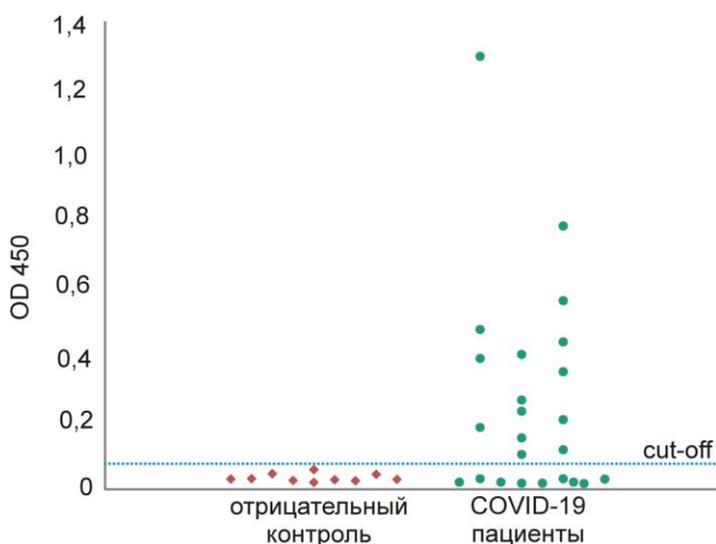
Рисунок 30. Экспрессия HEV/RBD в *N. benthamiana* с использованием вектора pAeff-HEV/RBD. SDS-PAGE (A, B) и вестерн блоттинг (C) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов; M, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрованного листа; 2, препарат 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. 31). 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 имеют сферическую форму.



**Рисунок 31.** Анализ структуры выделенных из растений-продуцентов частиц с помощью атомно-силовой (А) и электронной микроскопии (В).

Мы проанализировали, могут ли частицы HEV/RBD распознаваться человеческими антителами против SARS-CoV-2. 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. 32).



**Рисунок 32.** 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).

Это означает, что антитела, вырабатываемые у пациентов с COVID-19, могут связываться с полученными в растениях HEV/RBD частицами, что позволяет предположить, что RBD доступен для антител и, вероятно, экспонируется на поверхности частиц.

## 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 мкг с 1 г, являются растворимыми, выделяются с помощью металл-аффинной хроматографии с конечным выходом 150 – 200 мкг 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.

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

Гликопротеин S и его фрагменты считаются хорошими 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 аа) и укороченный вариант RBD (319-524 аа), соответствующих изоляту Wuhan-Hu-1.

При экспрессии белков SARS-CoV-2 в *N. benthamiana* уже на вторые сутки после инфекции в зонах агроинфильтрации начинали появляться признаки некроза для всех полученных фрагментов S белка SARS-CoV-2. Анализ экспрессии не позволил выявить целевые белки в листьях растений-продуцентов, как в растворимой фракции, так и в суммарном белковом препарате. Однако с помощью металл-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях из большего объема листьев удалось получить белковый препарат RBD (319-524 аа). Выход очищенного белка RBD\_319-524 составил ~ 15 мкг/г

листа, что близко к результатам других работ, в которых RBD фрагмент экспрессировали в растениях.

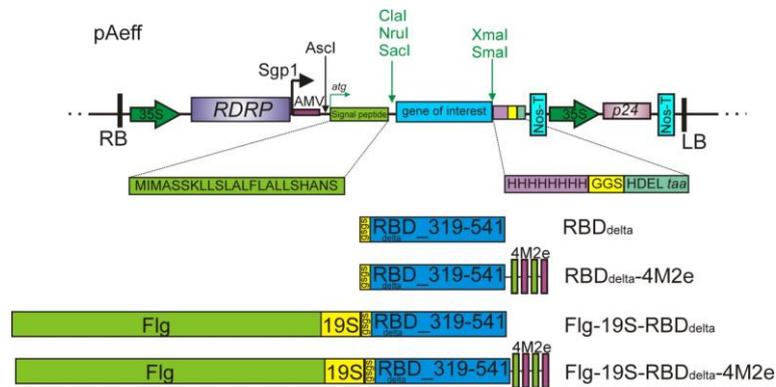
Достигнутый уровень экспрессии является низким и не позволяет получать практически-значимые количества антигена. Поэтому для повышения уровня экспрессии мы присоединили пептид RBD\_319-524 к носителю, эффективно экспрессирующемуся в растениях. В качестве такого носителя был использован флагеллин. Флагеллин с присоединенным к его С- концу RBD\_319-524 (Wuhan-Hu-1) при экспрессии в растениях оказался преимущественно нерастворимым. Выход белка после очистки составлял 90 – 100 мкг с 1 г. Данный уровень значительно превышает эффективность экспрессии RBD без белка-носителя.

Так как RBD содержит функционально-значимые сайты гликозилирования, на следующем этапе Flg-RBD клонировали в векторе pEff-SP, который обеспечивает таргетинг белка в эндоплазматический ретикулум. В этом случае белок перешел в растворимую фракцию, а выход его повысился. Поэтому далее был использован вектор pAeff, обеспечивающий синтез целевого белка в эндоплазматическом ретикулуме.

#### *Экспрессия гибридных белков, включающих RBD и M2e пептид вируса гриппа.*

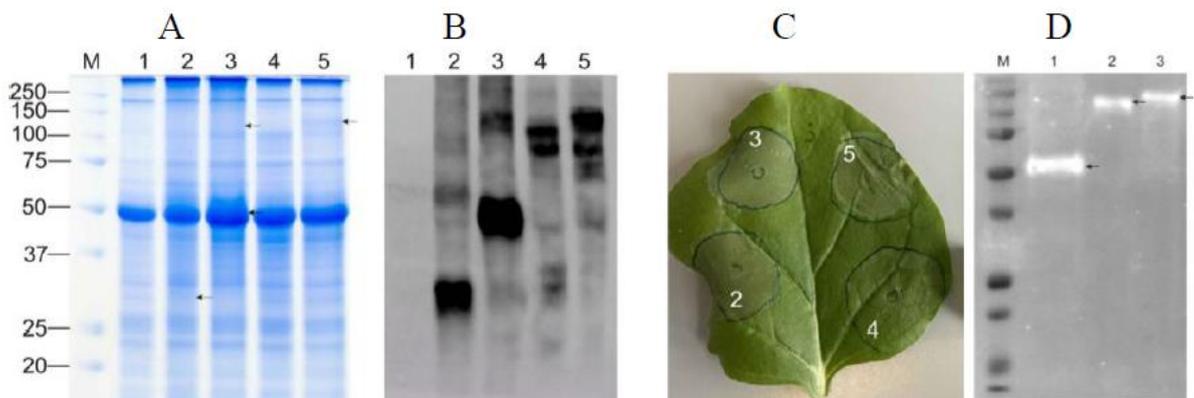
Вирус гриппа А и коронавирус SARS-CoV-2 являются актуальными патогенами с точки зрения разработки бивалентных вакцин. Пептид M2e вируса гриппа А рассматривается как антиген для разработки рекомбинантных «универсальных» вакцин против гриппа, тогда как RBD коронавируса является перспективным антигеном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

S белок SARS-CoV-2 имеет 22 потенциальных сайта N-гликозилирования (N-X-S/T). 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. Для получения гликозилированных вариантов рекомбинантных белков мы использовали стратегию направления белков в эндоплазматический ретикулум. 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 (рис 33).



**Рисунок 33.** Структура экспрессионных векторов. Показаны области Т-ДНК рекомбинантных бинарных векторов.

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. 34). 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.



**Рисунок 34.** SDS-PAGE (A) и вестерн блоттинг (B) белковых препаратов, выделенных из растений-продуцентов; Фото листа на 4 сутки после инфильтрации (C). М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, препарат суммарного белка, выделенного из неинфильтрированного листа; 2, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфильтрированного рAeff-RBD<sub>delta</sub> (30 кДа); 3, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфильтрированного рAeff-RBD<sub>delta</sub>-4M2e (43 кДа); 4, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфильтрированного рAeff-Flg-19S-RBD<sub>delta</sub> (83 кДа); 5, препарат суммарного белка, выделенного из листа, инфильтрированного рAeff-Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e (95 кДа); (B), вестерн блоттинг суммарных белковых препаратов проводили с использованием моноклональных антител на RBD. (D) Анализ гликозилирования очищенных белков (B). М, маркер молекулярного веса (кДа); 1, очищенный препарат RBD<sub>delta</sub>-4M2e; 2, Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>; 3, Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e. Гликозилирование проявляется в «осветлении» соответствующей полосы на фотографии геля.

Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью металл-аффинной хроматографии в нативных или денатурирующих условиях в соответствии с их растворимостью. Белки на основе флагеллина очищали в денатурирующих условиях для предотвращения протеолитической деградации. Финальный выход очищенного препарата RBD<sub>delta</sub> составил 20 мкг на 1 грамм листьев. Выход после очистки рекомбинантных белков RBD<sub>delta</sub>-4M2e, Flg-19S-RBD<sub>delta</sub> и Flg-19S-RBD<sub>delta</sub>-4M2e составлял 60, 60 и 90 мкг на 1 грамм листьев, соответственно.

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. 34).

Таким образом, 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.

### **Заключение**

В данной работе создана серия 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 представлены экспрессируемые антигены и используемые векторы. Разработанные методы получения в растениях-биофабриках кандидатных вакцин могут быть применены для масштабного производства.

Таблица 5. Основные характеристики растительных систем экспрессии

Белок	Вектор	Уровень экспрессии	Выход после очистки	Образование VLP	Иммунногенность	Протективное действие (% защиты, инфекционная доза, вирус)
<b>Грипп</b>						
M2epHbc	pA7248 AMV	1-2% от растворимой фракции	NR	~ 30 нм	+	90%, 1 LD <sub>50</sub> A/Chicken/Kurgan/05/2005
M2epHbc	pEff	5-10% от растворимой фракции	NR	~ 30 нм	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 нм	+	NR
<b>Гепатит E</b>						
HEV 110-610	pEff	300 мкг/г	150-200 мкг/г	~ 20 нм	+	NR
<b>COVID-19</b>						
RBD 319-524	pEff	NR	~15 мкг/г	NA	NR	NR
HEV/RBD	pAeff	80-100 мкг/г	20 мкг/г	~ 30 нм	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 образовывать; NR, не определяли

## 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 М2е пептидом вируса гриппа А образовывал *in vivo* вирусоподобные частицы, а при иммунизации мышей индуцировал эффективный иммунный ответ против М2е и обеспечивал защиту от летальной гриппозной инфекции.
4. Экспрессированный в растениях химерный белок Flg-4М, содержащий флагеллин бактерии *Salmonella typhimurium*, соединенный с четырьмя тандемными копиями М2е пептида вируса гриппа А, при интраназальной иммунизации мышей индуцировал высокие уровни М2е-специфических сывороточных антител и обеспечивал защиту от летальной гриппозной инфекции.
5. Экспрессированный в растениях химерный белок Flg4М2еНА2-1, содержащий флагеллин с присоединенными к нему консервативным фрагментом гемагглютинаина и четырьмя копиями М2е пептида вируса гриппа А, при интраназальной иммунизации мышей индуцировал высокие уровни М2е-специфических сывороточных антител при слабом иммунном ответе в отношении гемагглютинаина, и обеспечивал защиту от летальной гриппозной инфекции.
6. Белки Flg-4М и Flg4М2еНА2-1 могут быть использованы в качестве основы кандидатной «растительной» вакцины от гриппа А, которую можно вводить интраназально.
7. Укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита Е, экспрессированный в растениях, образовывал *in vivo* вирусоподобные частицы, обладающие высокой иммуногенностью. Этот белок может быть использован для разработки кандидатных вакцин от вируса гепатита Е и диагностикумов.
8. Показана возможность получения в растительной системе экспрессии вирусоподобных частиц, образуемых капсидным белком вируса гепатита Е, в который включены М2е пептид вируса гриппа А 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 А, 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 А и COVID-19, с интраназальным способом введения.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных изданиях

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. ИФ WoS 4,5. 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. ИФ WoS 5,6. 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. ИФ WoS 4,5. 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. ИФ WoS 4,5. 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. ИФ WoS 7,8. Доля участия = 30%. 0.5 п. л.
6. **Mardanova, 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. ИФ WoS 1,682. Доля участия = 90%. 1.8 п. л.
7. **Mardanova, 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. ИФ WoS 2,7. Доля участия = 70%. 0.5 п. л.
8. Blokhina, E.A., **Mardanov, 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. ИФ WoS 4,5. Доля участия = 50%. 0.7 п. л.
  9. Zahmanova, G.G., Mazalovska, M., Takova, K.H., Toneva, V.T., Minkov, I.N., **Mardanov, 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. ИФ WoS 4,5. Доля участия = 30%. 0.6 п. л.
  10. Tsybalova, L.M., Stepanova, L.A., Shuklina, M.A., **Mardanov, 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. ИФ WoS 3,7. 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 гемагглютинирина вируса гриппа. *Прикладная биохимия и микробиология*, т. 54, № 4, с. 385–390. ИФ WoS 0,8. Доля участия = 50%. 0.3 п. л.
  12. **Mardanov, E.S.**, & Ravin, N.V. (2018). Plant-produced recombinant influenza A vaccines based on the M2e peptide. *Current Pharmaceutical Design*, 24(12), 1317-1324. ИФ WoS 3,1. Доля участия = 90%. 0.8 п. л.
  13. Stepanova, L.A., **Mardanov, 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. ИФ WoS 11. 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 гемагглютинирина 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. ИФ WoS 5,6. Доля участия = 80%. 0.8 п. л.
16. **Mardanovа, 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. ИФ WoS 4,9. Доля участия = 60%. 0.8 п. л.
17. **Mardanovа, 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, 1-10. ИФ WoS 3,5. 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. ИФ WoS 2,8. 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. ИФ WoS 1,2. 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.