

НОВАЯ РАСТИТЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИОННАЯ СИСТЕМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ

Член-корреспондент РАН Р. К. Саляев^{1,*},
Н. И. Рекославская^{1,2,**}, А. С. Столбиков

Поступило 05.09.2018 г.

Для усиления синтеза антигенных белков оболочки L1 высокоонкогенных типов папилломавирусов ВПЧ16, ВПЧ18, ВПЧ31 и ВПЧ45 в генетическую конструкцию включили последовательность гена, кодирующего репликазу вируса мозаики огурца (RdRP CMV). Это позволило увеличить продукцию данных антигенных белков до 25–27 мкг на 1 мг общего растворимого белка.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, репликаза CMV (RdRP), главный белок оболочки L1, вакцина.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524844503-506>

Благодаря высокой активности РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) в РНК-содержащих вирусах во многих исследованиях регуляторный ген *rdrp* этого фермента включается в генетические конструкции для увеличения продукции антигенных белков при разработке вакцин, например, против пандемического и сезонного гриппа [1], вируса лихорадки Эбола [2] и др. Это позволяет значительно увеличить продукцию целевого белка. В отдельных случаях выход целевого белка может составлять 80% от общего растворимого белка (ОРБ), например, в листьях табака [3]. По данным литературы [4] RdRP также обеспечивает стабильную активацию врождённого иммунитета.

В настоящей работе для создания новой вакцины против папилломавирусов мы использовали репликазу вируса мозаики огурца *Cucumber mosaic virus* (CMV). Последовательность подтипа CMV New Delhi [5] была изолирована из растений томата, у которого данный подтип CMV вызывает те же симптомы, что и у растений огурца. Репликазу поместили в сегмент РНК2 CMV. Этот сегмент содержит перекрывающиеся матрицы для синтеза белков 2a и 2b, из которых белок 2a представляет собой собственно репликазу или RdRP, а белок 2b выполняет функцию суперсупрессора

РНК-интерференции, индуцируемой вследствие инфицирования вирусом и накопления вирусных мРНК в растительных клетках хозяина [5].

Дизайн генетической конструкции, используемой для разработки квадريفалентной профилактической вакцины, показан на схеме:



Целевой ген *hpv16 L1* был нами поставлен под контроль промотора p35S CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), не совпадающего по последовательности с p35S CaMV для RdRP. В генетическую конструкцию также ввели последовательности RB и LB Т-ДНК *A. tumefaciens* для стабильной инсерции в геном томата. Для усиления экспрессии в генетическую конструкцию поместили также вирусные регуляторные элементы 5'-НТО TEV (*Tobacco etch virus*) и терминатор t35S CaMV.

Вставка генетических конструкций для ядерной трансформации растений томата в рBINPLUS/ARS и синтез в соответствии с нашим дизайном осуществили на фирме “Genscript” (США). Размеры конструкций (в п.н.) составили 7897 для ВПЧ16 L1, 8108 для ВПЧ18 L1, 7816 для ВПЧ31 L1, 7912 для ВПЧ45 L1 и не превысили размеры Т-ДНК дикого типа *A. tumefaciens*, в которой обычно присутствуют 6 генов длиной примерно по 1500 п.н. Затем генетические конструкции, вставленные в рBINPLUS/ARS, помещали в клетки *A. tumefaciens* ЕНА105. Экспрессию целевых белков в бактериальных колониях оценивали с помощью Вестерн-блот-гибридизации, используя для этого

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Иркутск

² Иркутский научный центр Сибирского отделения
Российской Академии наук

* E-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

** E-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

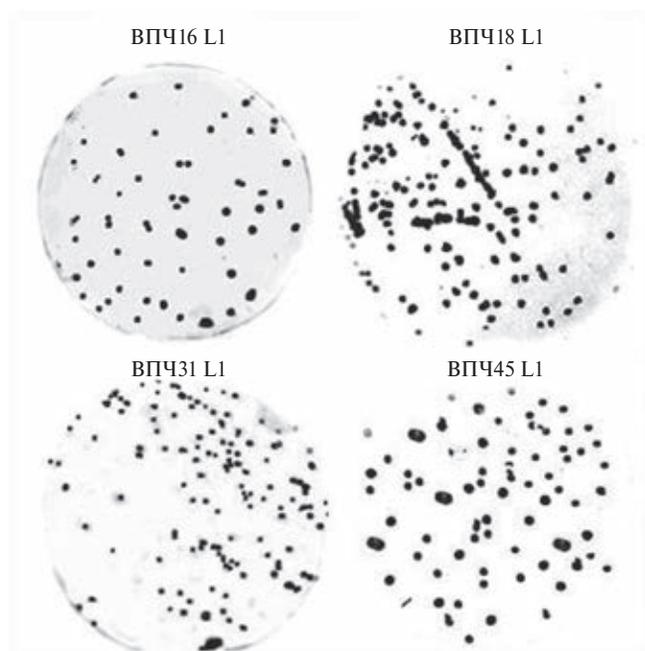


Рис. 1. Вестерн-блот-гибридизация колоний клеток *A. tumefaciens* с рVINВПЧ16 L1, рVINВПЧ18 L1, рVINВПЧ31 L1 и рVINВПЧ45 L1. Первичные антитела — антитела против ВПЧ16 L1 и ВПЧ18 L1, вторичные — специфичные к мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Субстрат — 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат, окислитель — нитросиний тетразолий.

первичные антитела к ВПЧ16 L1 и ВПЧ18 L1 фирмы “GenWay Biotech. Inc.” (США).

По отпечаткам на дисках нитроцеллюлозных мембран можно видеть (рис. 1), что колонии *A. tumefaciens* эффективно синтезируют соответствующие типы “позднего” антигенного белка L1 папилломавирусов. После проверки на наличие “позднего” антигенного белка оболочки ВПЧ соответствующие образцы суспензии *A. tumefaciens* использовали для генетической трансформации плодов томата, которую осуществляли по ранее описанному методу [6] с помощью вектора *A. tumefaciens* ЕНА105.

Для трансформации использовали плоды томата розовоплодных гибридов в начале созревания, в которые вносили по 1 мл агробактериальной суспензии в растворе, содержащем 1 мкмоль ацетосирингона (“Sigma-Aldrich”, США) в 5%-й глюкозе, путём инъектирования с помощью одноразового шприца в каждый локулюс (семенная камера). Далее трансформированные плоды инкубировали в холодильнике при 6–8°C в течение 15–20 сут в темноте. По окончании инкубации плоды лиофильно высушивали и затем проводили экстракцию белков по методу [7]. При проведении этой процедуры использовали буфер следующего состава: 100 мМ HEPES (“Sigma-Aldrich”), 150 мМ NaCl, 2% Igepal (“Sigma-Aldrich”) и ингибиторный коктейль COMPLETE™ EDTA-FREE PROTEINASE INHIBITOR COCKTAIL (“Boehringer Mannheim GmbH”, Германия), pH 7,4. Далее в экстрактах определяли присутствие антигенных белков с помощью нативного электрофореза на приборе PhastSystem (“Pharmacia”, Швеция) и с помощью Вестерн-блот-гибридизации. На пластинки PhastGel™ Gradient 4–15 (“GE Healthcare”, США) наносили по 0,5 мкл экстракта размельчённого и лиофильно высушенного материала плодов и проводили нативный электрофорез, используя буферные полоски PhastGel™ Native Buffer Strips (“GE Healthcare”) для разделения белков ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 (рис. 2).

На электрофореграммах видно, что количество антигенных белков в плодах намного превышало таковое стандартного белка (2,5 мкг на пятно, крайняя левая полоска на электрофореграммах).

Количество антигенных белков на единицу ОРБ, определённое с помощью иммуоферментного анализа в экстрактах лиофильно высушенных плодов томата, составило следующие величины (нг/мг ОРБ): ВПЧ16 L1 — 25400 ± 300 (здесь и далее $M \pm m$, $n = 80$), ВПЧ18 L1 — 26300 ± 1000 , ВПЧ31 L1 — 25900 ± 700 , ВПЧ45 L1 — 26700 ± 600 . Можно видеть, что в экстрактах лиофильно

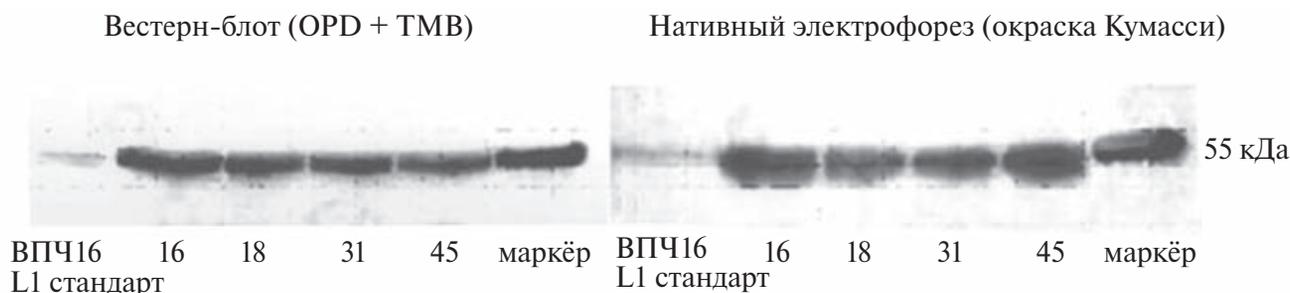


Рис. 2. Результаты нативного электрофореза в полиакриламидном геле (справа) и Вестерн-блот-гибридизации четырёх типов экстрактов антигенных белков ВПЧ16 L1 (16), ВПЧ18 L1 (18), ВПЧ31 L1 (31) и ВПЧ45 L1 (45) (слева).

Таблица 1. Содержание антигенных белков патогенных вирусов в трансгенных растениях томата, в которых гены, кодирующие антигенные белки, находятся под контролем разных регуляторных элементов

Регуляторные и целевые гены	Количество антигенного белка, нг/мг ОРБ
p35 S TBI-HBS (ВИЧ-1 + ВГВ)	p24 (gag) ВИЧ-1* 10,0 ± 1,5, n = 160 [8] HBS ВГВ** 19,1 ± 8,9, n = 240 [8]
p35 S PreS2-S (ВГВ)	237,3 ± 15,0, n = 180 [9]
p35 S 'Ω 5'-НТО ВТМ HPV16 L1	2330,0 ± 112,4, n = 360 [10]
p35 S RdRP p35 S HPV16 L1	25 400,0 ± 300, n = 80 (настоящая работа)

M ± m. * Использовали первичные антитела против p24 ВИЧ-1, ** использовали первичные антитела против HBS ВГВ.

высушенных плодов содержание антигенного белка L1 всех четырёх типов достаточно стабильно и составляет от 25 000 до 26 000 нг/мг ОРБ.

В табл. 1 для сравнения представлены полученные нами ранее и в настоящей работе данные о генетических конструкциях и полученных с их помощью вирусных белках. В таблице приведены следующие варианты: химерный ген TBI-HBS, кодирующий эпитопы белков Env (белок оболочки), и Gag (ген p24, ассоциированный с антигенами ВИЧ-1), индуцирующие Т- и В-лимфоциты, и ген, кодирующий основной белок оболочки HBS вируса гепатита В (ВГВ) [8]; ген, кодирующий белок оболочки PreS2-S ВГВ [9]; ген, кодирующий главный белок оболочки папилломавируса ВПЧ16 L1 под контролем омега-лидера 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) вируса мозаики табака (ВТМ) [10]; ген *rdrp*, кодирующий репликазу CMV, сопряжённый с геном *hvp16* L1 папилломавируса типа 16 под контролем промотора p35S.

Из приведённых в табл. 1 данных можно видеть, что использование стандартных регуляторных элементов, таких как p35S, даёт слабую продукцию антигенных белков. Более высокую продукцию показывает омега-лидер ВТМ (Ω-5'-НТО ВТМ), значительно увеличивающий количество антигенного белка. Наибольшую продуктивность в настоящей работе обеспечила последовательность RdRP CMV.

Сравнение этих результатов с фирменным препаратом “Гардасил” (четырёхвалентная вакцина против вирусов 16, 18, 6 и 11 производства “Merck & Co.”, США), в которой содержание антигенных белков в 0,5 мл раствора составляет суммарно 120 мкг, показало, что с помощью нашей экспрессионной системы можно получить большее, чем в препарате “Гардасил”, количество антигенных белков папилломавирусов.

В заключение следует отметить, что разработанная нами растительная экспрессионная

система с включением вирусных регуляторных генов *rdrp* и структурных элементов позволяет многократно усилить продукцию антигенных белков при разработке пероральных вакцин против опасных папилломавирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chichester J.A., Jones R.M., Green B.J., Stow M., Miao F., Moonsammy G., Streatfield S. J., Yusibov V. // *Viruses*. 2012. V. 4. № 11. P. 3227–3244.
2. Phoolcharoen W., Dye Q., Kilbourne J., Piensook K., Pratt W.D., Arntzen Ch., Chen Q., Mason H.S., Herbst-Kralovetz M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 31. P. 20 695–20 700.
3. Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 18. P. 6852–6857.
4. Painter M.M., Morrison J.H., Zeeoklein L.J., Rinkoski T. A., et al. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. № 12. P. 1–22.
5. Koundal V., Mohd Q., Haq R., Praveen S. // *Biochem. Genet.* 2011. V. 49. № 1. P. 25–38.
6. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. // *ДАН*. 2012. Т. 446. № 5. С. 583–586.
7. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Хэммонд Р.В., Щелкунов С.Н. // *ДАН*. 2009. Т. 425. № 6. С. 833–836.
8. Shchelkunov S.N., Salyaev R.K., Posdnyakov S.G., Rekoslavskaya N.I., Nesterov A.E., Ryzhova T.S., Sumtsova V.M., Pakova N.V., Mishutina U.O., Kopytina T.V., Hammond R.W. // *Biotechnol. Lett.* 2006. V. 28. № 13. P. 959–967.
9. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. // *ДАН*. 2012. Т. 446. № 5. С. 583–586.
10. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. // *ДАН*. 2016. Т. 468. № 2. С. 225–227.

THE NEW PLANT EXPRESSION SYSTEM FOR THE DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST PAPILLOMAVIRUSES

Corresponding Member of the RAS **R. K. Salyaev,**
N. I. Rekoslavskaya, A. S. Stolbikov

Received September 5, 2018

To enhance the synthesis of the main antigenic coat proteins L1 of high risk oncogenic papillomaviruses types HPV16, HPV18, HPV31 and HPV45, the sequence of the gene encoding the cucumber mosaic virus replicase (RdRP CMV) was inserted into the genetic construct. This inclusion has made possible to increase highly the production of these antigenic proteins to 25–27 µg per 1 mg of total soluble protein of transformed tomato fruit.

Keywords: human papillomavirus, replicase CMV, RdRP, main coat protein L1, vaccine.