



# Растительные системы экспрессии в качестве продуцентов рекомбинантных фармацевтически ценных белков

Е.В. Дейнеко , А.А. Загорская

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Рынок фармацевтически ценных белков – наиболее быстро развивающийся сегмент экономики. Большая часть биофармацевтиков получена в клетках млекопитающих и микроорганизмов, однако обе системы обладают рядом недостатков. Растительные клетки сочетают в себе достоинства эукариотической системы наработки белка и простоту и дешевизну бактериальной. Использование растений для получения рекомбинантных белков – экономически значимое и перспективное направление. Преимуществом растительных систем является более низкая стоимость культивирования клеток. Они свободны от нежелательных компонентов, таких как эндотоксины бактерий, гипергликозилированные белки, продуцируемые дрожжами, патогены животных и человека в клеточных культурах трансгенных животных. Растения относятся к высшим эукариотам, поэтому в их клетках происходит полноценный фолдинг и образование сложных мультимерных белковых комплексов, а также значительная часть посттрансляционных модификаций аналогично таковым в клетках млекопитающих. Развиваемые ныне растительные системы экспрессии рекомбинантных белков чрезвычайно разнообразны и насчитывают более 100 различных технологий, основанных на разных видах растений, способах переноса генов, экспрессионных стратегиях, методах последующего извлечения целевого белка и пр. К ним относятся ядерная и пластидная трансформация, транзистентная и стабильная экспрессия при трансформации с помощью агробактериального переноса, бомбардировки или электропорации, культивирование целых наземных или водных растений, растительных тканей или суспензионных клеточных культур в качестве экспрессионных систем. В обзоре анализируется современное состояние исследований в области использования растительных систем экспрессии для наработки рекомбинантных фармацевтических белков. Сделан акцент на преимуществах культур растительных клеток по сравнению с другими системами экспрессии. Описаны растительные системы для наработки рекомбинантных белков, такие как транспластомные растения, культуры мхов и водных растений, а также суспензионные культуры клеток высших растений. Рассмотрено современное состояние рынка рекомбинантных белков, полученных с применением растительных систем экспрессии. Обсуждаются перспективы растительных («съедобных») вакцин, созданных на основе генетически модифицированных растений.

Ключевые слова: системы экспрессии; трансгенные растения; биопродуценты; рекомбинантные белки; растительные вакцины.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дейнеко Е.В., Загорская А.А. Растительные системы экспрессии в качестве продуцентов рекомбинантных фармацевтически ценных белков. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):979-985. DOI 10.18699/VJ17.322

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Deineko E.V., Zagorskaya A.A. Plant expression systems for production of recombinant pharmaceutically important proteins. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):979-985. DOI 10.18699/VJ17.322 (in Russian)

Received 08.11.2017

Accepted for publication 30.11.2017

© AUTHORS, 2017

## Plant expression systems for production of recombinant pharmaceutically important proteins

E.V. Deineko , A.A. Zagorskaya

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The market of pharmaceutically valuable proteins is the fastest growing segment of the economy. Most biopharmaceuticals have been obtained in mammalian and microorganism cells, but both systems have a number of disadvantages. Plant cells combine the advantages of the eukaryotic system of protein production and the simplicity and cheapness of the bacterial, and the use of plants for the production of recombinant proteins is an economically important and promising direction. The advantage of plant systems is the lower cost of cell cultivation. They are free from unwanted components, such as bacterial endotoxins, hyperglycosylated proteins produced by yeast, animal and human pathogens in cell cultures of transgenic animals. In addition, plants are higher eukaryotes, and therefore full-value folding and the formation of multimeric protein complexes occur in their cells, as well as a significant portion of post-translational modifications similar to those in mammalian cells. The currently developed plant expression systems for recombinant proteins are extremely diverse and number more than 100 different technologies based on different plant species, gene transfer methods, expression strategies, methods for the subsequent extraction of the target protein, etc. This is nuclear and plastid transformation, transient and stable expression during transformation using agrobacterial transport, bombardment or electroporation, cultivation of whole terrestrial or aquatic plants, plant tissues or suspension cell cultures as expression systems. The review examines the current state of research in the use of plant expression systems for the production of recombinant proteins for pharmaceuticals. The emphasis was placed on the advantages of plant cell cultures in comparison with other expression systems. Specific examples discuss promising plant systems for the production of recombinant proteins, such as transplastomic plants, moss and aquatic plant cultures, as well as suspension cultures of cells of higher plants. The current state of the market for recombinant proteins obtained using plant expression systems is considered. The prospects of creating plant ("edible") vaccines based on genetically modified plants are discussed.

Key words: expression systems; transgenic plants; bioproducers; recombinant proteins; plant vaccines.

В настоящее время большое число белков медицинского назначения получают не из природных источников, а при синтезе их рекомбинантных аналогов. Для этих целей используются различные системы экспрессии: бактериальные (*Escherichia coli*), дрожжевые (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Hansenula polymorpha*), клетки животных (клетки яичников китайского хомячка) и др. Это позволяет нарабатывать в промышленных масштабах белки, которые было бы невозможно в достаточном количестве получить традиционными методами экстракции (например, инсулин или гормон роста человека). Получение рекомбинантных белков основано на технологии рекомбинантных ДНК, включающей клонирование целевого гена, кодирующего фармацевтически ценный (целевой) белок, и его перенос в геном клеток, в которых данный целевой белок будет синтезирован.

Для бактериальных систем экспрессии характерны относительная простота генно-инженерных манипуляций, высокая скорость деления клеток и, соответственно, значительный выход биомассы, высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков и возможность масштабного производства белка в биореакторах. Однако прокариотическая клетка не в состоянии осуществлять многие посттрансляционные модификации синтезируемого рекомбинантного белка, включая прежде всего его гликозилирование и корректное образование дисульфидных связей. Следует отметить, что некорректные посттрансляционные модификации или их отсутствие могут сильно повлиять на свойства рекомбинантного белка, в том числе на его биологическую активность и фармакокинетику. Таким образом, прокариотические системы экспрессии используются для синтеза относительно простых терапевтических белков, таких как инсулин, интерферон или гормон роста человека. Немаловажным является и этап выделения рекомбинантного белка, синтезируемого в прокариотической системе экспрессии, поскольку именно этот этап связан с очисткой целевого продукта от пирогенных эндотоксинов и других продуктов метаболизма бактериальных клеток в культуре. В среднем выход рекомбинантного белка в бактериальной системе экспрессии составляет от 20 до 400 мг/л культуральной среды.

Наиболее приближенно к человеческому типу посттрансляционные модификации рекомбинантного белка осуществляются в системах экспрессии, основанных на культурах клеток млекопитающих (Casteleijn, Richardson, 2014), но и эти системы не лишены недостатков. К ним относятся высокая стоимость культивирования, трудности с масштабированием процесса и потенциальная заражаемость клеточной культуры патогенами человека и животных. Использование дрожжей для наработки рекомбинантных белков часто сопровождается некорректными посттрансляционными модификациями, связанными с образованием гипергликозилированных рекомбинантных белков.

В последние 10–15 лет интенсивно возрастает интерес к альтернативным системам экспрессии, в частности к растительным клеткам, культивируемым в биореакторах. Растительные суспензионные клеточные культуры лишены вышеперечисленных недостатков и чрезвычайно

перспективны для этих целей, сочетая достоинства эукариотических систем экспрессии и простоту и дешевизну бактериальных.

Рынок фармацевтически ценных белков растет быстрее, чем фармацевтический рынок в целом, и по прогнозам специалистов будет достигать к 2020-му году 278.2 млрд долл. США (Casteleijn, Richardson, 2014). Крупнейшие биотехнологические и фармацевтические компании проявляют большую заинтересованность и инвестируют значительные средства в развитие научных исследований по разработке новых платформ для производства рекомбинантных белков и внедрения их в производство. Весьма привлекательными для исследователей и фармацевтических компаний становятся растительные системы экспрессии. Преимущество этих систем – относительно невысокая стоимость их культивирования. Они свободны от нежелательных компонентов, таких как эндотоксины бактерий или гипергликозилированные целевые белки, продуцируемые дрожжами, и в отличие от клеточных культур животного происхождения – от патогенов животных и человека. В клетках растений происходит корректный фолдинг и образование сложных мультимерных белковых комплексов, а также большая часть посттрансляционных модификаций целевых белков, необходимых для их биологической активности (Twyman et al., 2003; Nagels et al., 2012). В растительных клетках могут синтезироваться такие сложные белки млекопитающих, как коллагены, гемоглобин, иммуноглобулины. В ближайшем будущем получение рекомбинантных белков в культурах клеток высших растений, вероятнее всего, станет наиболее часто используемой из всех ныне применяемых растительных систем экспрессии.

Рекомбинантные белки в растительных системах могут синтезироваться при использовании различных платформ, основанных на разных видах растений, способах переноса генов, экспрессионных стратегиях, методах последующего извлечения целевого белка и пр. Это ядерная и пластидная трансформация, транзистная (Gleba et al., 2007; Huang, McDonald, 2009) и стабильная экспрессия при трансформации с помощью агробактериального переноса (Gelvin, 2003), бомбардировки или электропорации (Rosales-Mendoza, Tello-Olea, 2015), культивирование целых наземных или водных растений, растительных тканей или суспензионных клеточных культур в качестве экспрессионных систем.

Синтезированные рекомбинантные белки могут быть направлены в различные компартменты растительной клетки (вакуоли или люмены эндоплазматического ретикулума), а также в апопласт и различные органы растения (семена, клубни, плоды и т. д.). Благодаря этому рекомбинантные белки в растительных тканях могут быть длительное время сохранены без каких-либо изменений и снижения биологической активности (Daniell et al., 2005; Gleba et al., 2005).

Немаловажен и тот факт, что разработанные к настоящему времени методы агроботанического возделывания хозяйственно важных видов растений, а также системы семеноводства для той или иной культуры делают растения привлекательными для использования их в качестве биофабрик белков медицинского назначения.

## Перспективные растительные системы экспрессии для наработки рекомбинантных белков

К настоящему времени разработаны технологии получения генетически модифицированных (трансгенных) растений, в геном которых перенесены гены, кодирующие различные белки для медицинских целей, в том числе и белки человека. Более 200 биофармацевтиков уже представлены на рынке, и еще большее их количество проходит доклинические испытания. Крупнейшие биотехнологические и фармацевтические компании, такие как Eriocyte, Ventria, Medicago, Greenovation, LSBC и Pfizer, проявляют огромную заинтересованность и инвестируют в развитие научных исследований по разработке новых платформ для получения фармацевтически ценных белков и внедрения их в производство. Данные технологии основаны на прямом или векторном переносе целевых генов в ядерный геном растения. Получены десятки видов трансгенных растений, в геном которых перенесены последовательности антигенов различных возбудителей инфекционных заболеваний, разнообразных терапевтических белков, моноклональных антител (Howard, 2005; Tekoah et al., 2015). Однако использование растительных систем для производства рекомбинантных белков различного назначения сдерживается частично из-за недостаточно высокого уровня их накопления, который составляет, как правило, не более 1 % общего растворимого белка (ОРБ) (Пермякова и др., 2015).

В качестве альтернативных систем экспрессии рассматриваются внеядерные геномы (пластомы) хлоропластов растений. Технология трансформирования хлоропластов разрабатывалась как многообещающий подход в получении рекомбинантных белков. При трансформации пластида не наблюдается проблем, характерных для ядерной трансформации, таких как замолкание генов, эпигенетические эффекты или вариабельность экспрессии трансгенов. Высокий уровень экспрессии генов, перенесенных в хлоропластный геном, достигается высокой копийностью пластидной ДНК, а экологическая безопасность обеспечивается отсутствием чужеродных генов в пыльце. Однако необходимо подчеркнуть, что эти преимущества нивелируются методическими сложностями, связанными с переносом генов в пластомы растений, а также тем фактом, что транспластомные системы перспективны лишь в случае, когда целевой белок не подвергается сложным посттрансляционным модификациям.

Мощным толчком к развитию технологии получения рекомбинантных белков на основе хлоропластного генома послужило сообщение о создании транспластомных растений табака с выходом целевого белка (Cry2Aa2-белок из *Bacillus thuringiensis*) на уровне 46.1 % ОРБ (DeCosa et al., 2001). В последнее время интенсивно развиваются технологии создания транспластомных растений многих видов: сои (Dufourmantel et al., 2004), хлопка (Daniell, 2007), салата (Lelivelt et al., 2005) и др. Получено более 20 видов транспластомных растений, уровень накопления гетерологичных белков у которых составил (в расчете от ОРБ) от 6 % для интерферона-гамма и 19 % для интерферона-альфа человека до 33 % для инсулин-подобного фактора роста (IGF-1) человека.

Среди других альтернативных систем экспрессии рекомбинантных белков для фармакологии следует назвать культуры водных растений: водоросли, микроводоросли и ряска, обладающие высокими темпами роста на простых по составу и дешевых питательных средах или просто на воде, однако требующие освещения.

Ряска (*Lemna gibba*, ряска горбатая и *L. minor*, ряска малая) – многолетнее растение, относящееся к однодольным покрытосеменным растениям, которые обитают на поверхности стоячих пресных вод. Ряска привлекает внимание исследователей как потенциальная высокоэффективная система экспрессии гетерологичных белков благодаря своей способности к быстрому накоплению биомассы. Завершены работы по секвенированию хлоропластного генома ряски; для переноса в ее геном целевых генов разработаны методы агробактериальной трансформации и биобаллистики. Показано, что моноклональные антитела человека, синтезированные в тканях ряски, проявляют более высокую активность при связывании с соответствующими рецепторами по сравнению с их гомологами, полученными в клетках СНО-линии клеток яичников китайских хомяков (Cox et al., 2006). При наличии в генетической конструкции соответствующих сигнальных последовательностей рекомбинантный белок может быть секретирован в культуральную среду (Rosales-Mendoza, 2016).

Одноклеточные зеленые водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Tetraselmis suecica* и *Odontella aurita* рассматриваются как альтернативные системы экспрессии рекомбинантных белков (Taunt et al., 2017). Наиболее перспективна среди этих водорослей *C. reinhardtii*, получение рекомбинантных белков в которой основано на трансформации хлоропластов (Almaraz-Delgado et al., 2014). Около 40 % объема клетки этой водоросли занимает один хлоропласт большого размера. Первые генетически модифицированные водоросли на основе *C. reinhardtii* получены в 1988 г. (Boynnton et al., 1988). Интеграция фрагментов экзогенных ДНК в геном этой водоросли протекает по механизму гомологичной рекомбинации. Клеточные популяции водорослей гомогенны по размеру клеток, клеточная масса удваивается через каждые 4–8 ч культивирования (Franklin, Mayfield, 2004). Для культивирования *C. reinhardtii* возможно использование биореакторов больших объемов (до 500 тыс. л). Более того, способность секретировать белки в культуральную среду может существенно снизить стоимость рекомбинантного белка (Almaraz-Delgado et al., 2014).

Зеленый мох *Physcomitrella patens* – единственный представитель мохообразных, геном которого полностью секвенирован (Reinsing et al., 2008). Разработана методика трансформации *P. patens*. Первым успешным примером использования этого вида мха в качестве системы экспрессии рекомбинантных белков стало получение рекомбинантного эритропоэтина человека (Weise et al., 2007). Фирма Greenovation (Германия) разрабатывает технологию наработки биофармацевтических белков на основе *P. patens* в клеточной суспензионной культуре с применением биореакторов. Привлекательность этого вида мхов в качестве системы экспрессии рекомбинантных белков состоит в том, что фрагменты экзогенных ДНК могут быть

интегрированы в его геном по механизму гомологичной рекомбинации, что исключает возможное инактивирование в дальнейшем экспрессии перенесенных генов (трансгенов). *P. patens* рассматривается как перспективный кандидат на «молекулярное фермерство», поскольку в этой системе экспрессии белки эукариотического происхождения претерпевают посттрансляционную модификацию (гликозилирование, образование дисульфидных связей и т. д.). Если проводить сравнение белкового продукта, синтезируемого в клетках животных и в клетках *P. patens*, то последние имеют очевидное преимущество, поскольку отсутствует риск заражения культуры патогенами животного происхождения. К тому же клетки *P. patens* можно поддерживать в виде суспензионной культуры в контролируемых условиях (Reski et al., 2015). Однако большая часть уже существующих терапевтических белков получена с помощью стабильной ядерной трансформации с последующим выделением и их очисткой из трансгенных растений-регенерантов (Desai et al., 2010). В качестве вектора, как правило, используется *Agrobacterium tumefaciens*, способная трансформировать широкий спектр двудольных и однодольных растений. В растениях кукурузы, риса и ячменя синтезируются некоторые технические реагенты для диагностики (Howard, 2005; Fischer et al., 2012), а также ряд фармацевтических продуктов, находящихся на этапе клинических испытаний. Несмотря на очевидные преимущества использования растительных систем, внедрение новых методических разработок в производство происходит довольно медленно, и только немногие рекомбинантные белки, полученные из целых трансгенных растений, достигли рынка. Одна из причин этого – негативное общественное мнение, сложившееся вокруг генно-модифицированных растений, а также несовершенство законодательной базы, на основании которой такие продукты могут попасть к потребителю.

### Суспензионные клеточные культуры

Перспективным направлением, позволяющим преодолеть существенные недостатки использования трансгенных растений в качестве биофабрик, представляется культивирование растительных клеток в ферментерах. Возможность получения рекомбинантных белков в суспензиях растительных клеток показана более 25 лет назад, однако долгое время исследования были сосредоточены на использовании для синтеза целых растений. Отношение к использованию суспензий растительных клеток начало меняться после всплеска коммерческого интереса к получению рекомбинантных белков, столкнувшегося с отсутствием регулирующих законов и настороженностью по отношению к ГМО, особенно в Европе. Технология культивирования растительных клеток обеспечивает точное соблюдение условий выращивания клеток в отличие от полевых условий, где существует погодная, климатическая, почвенная составляющие, а также влияние вредителей, травоядных животных и различных микроорганизмов (Rybicki, 2010; Fischer et al., 2012). Выращивание суспензионных культур клеток в стерильных реакторах не только элиминирует риск заражения культуры клеток микотоксинами и пестицидами (Hellwig et al., 2004; Fischer et al., 2012), но также снижает до минимума возможность

переноса генетически модифицированных клеток в окружающую среду.

Неоспоримым преимуществом системы культивирования суспензионных культур клеток по сравнению с выращиванием целых растений является их быстрый рост. В экспоненциальной фазе роста для удвоения клеток необходимо 2–3 суток, один цикл культивирования клеток ВУ-2 табака, например, составляет 1–2 недели, в то время как на получение растений уходит несколько месяцев (Kaldis et al., 2013).

Существенное достоинство культуры растительных клеток как экспрессионной системы – их способность продуцировать и секретировать биологически активные белки через мембрану и клеточную стенку в межклеточное пространство. Этот процесс метаболически зависим и может обеспечиваться специфическими лидерными последовательностями пептидов как растительного, так и животного происхождения (Magnuson et al., 1998). Благодаря накоплению рекомбинантных белков в среде при культивировании суспензий растительных клеток упрощается процесс их извлечения и очистки. Переработка растительных тканей и целых растений связана с трудоемкой и затратной процедурой экстракции, а выделение из среды облегчается в связи с возможностью быстрого отделения клеток, в которых содержится большее количество сопутствующих белков. Целевые белки, секретируемые в культуральную среду, характеризуются также высокой степенью целостности и однородностью, так как их транспорт из клетки происходит после полного процессирования, т. е. после полного удаления сигнальных пептидов и присоединения гликановых структур, если конечный продукт является гликопротеином. В том случае, если рекомбинантные белки накапливаются в больших количествах внутри клеток, их получение связано с очисткой от непротессированных, незрелых и сигнальных белков и гетерологичных гликанов. По неопубликованным данным (цит. по: Schillberg et al., 2013), антитела, извлеченные из культуральной среды при выращивании клеток табака ВУ-2, представляют собой гомогенный комплекс из трех гликоформ с доминирующей формой, представленной 87 %, тогда как эти же антитела синтезируются в целых растениях в виде шести различных гликановых форм.

Перспективность суспензионных культур растительных клеток в качестве платформы для получения рекомбинантных белков стала очевидной после сообщения крупнейшей фармацевтической компанией США (Pfizer) о выпуске на рынок  $\alpha$ -галиглюцефразы, синтезированной клетками моркови в биореакторах. Именно после внедрения производства  $\alpha$ -галиглюцефразы в клетках моркови был открыт путь к полному принятию этой технологии и пересмотру главенствующей поначалу идеи использования целых растений. К настоящему времени созданы и успешно используются для производства биофармацевтиков клеточные линии табака ВУ-2 (Bright Yellow-2) (Nagels et al., 2012), риса (Schiermeyer, Schillberg, 2012), люцерны (Huang, McDonald, 2009), моркови (Rosales-Mendoza, Tello-Olea, 2015) и др. Эти клеточные культуры отличаются высокими темпами роста и восприимчивостью к трансформации с помощью *A. tumefaciens*.

Несмотря на успешность использования суспензионных клеточных культур растений для коммерческого получения фармацевтических белков, существует еще много нерешенных проблем, наиболее важной из которых является недостаточно высокий выход рекомбинантного белка. Именно на этих проблемах сосредоточено внимание исследовательских групп и биотехнологических компаний.

### **Современное состояние рынка рекомбинантных белков медицинского назначения, полученных на основе генетически модифицированных растений**

В последние годы около 15 зарубежных фирм связывают свою деятельность с наработкой фармацевтических белков медицинского назначения в генетически модифицированных растениях (Tiwari et al., 2009; Martinez et al., 2012). Среди них следует отметить Planet Biotechnology, Dow AgroSciences, Protalix Biotherapeutics, Medicago, Biolex, Novoplant и др. Деятельность этих фирм основана на использовании таких растений, как табак, люцерна, рис, подсолнечник, ячмень, горох, кукуруза и *Arabidopsis thaliana*. Необходимо отметить, что в большей части работ по получению рекомбинантных белков используются генетически модифицированные растения с ядерной трансформацией, т. е. доставкой чужеродного гена в ядерный геном растения. Фирмы Chlorogen и Bayer для получения рекомбинантных белков используют транспластомные растения, а также метод агроинфильтрации, базирующийся на транзитной (временной) экспрессии чужеродных генов в растительных клетках. Часто для одних и тех же ценных фармацевтических белков фирмами разрабатываются различные оригинальные методики получения. Ярким примером может служить производство апротинина – поливалентного ингибитора протеиназ, относящегося к антиферментным препаратам. Этот белок применяется в качестве препарата, оказывающего антипротеолитическое, антифибринолитическое и гемостатическое действие и используется в медицине уже более 40 лет. Источником апротинина являются органы (легкие и др.) крупного рогатого скота. Разработан способ получения рекомбинантного апротинина с использованием *S. cerevisiae* (Apeler et al., 2004). Путем сравнительного анализа систем экспрессии на основе растительных клеток и тканей для наработки апротинина установлено, что в тканях табака при ядерной трансформации накапливалось 0.03 % этого белка от ОБР, в тканях люцерны – 0.1, в семенах кукурузы – 8.9, в тканях ряски – 3.7, а в тканях табака при агроинфильтрации – 4.2 % (Sourrouille et al., 2009). Рекомбинантный апротинин не отличался по качеству от соответствующего белка, выделенного из тканей крупного рогатого скота (Sourrouille et al., 2009). Такие фирмы, как ProdiGene, Medicago и Large Scale Biology Corporation используют кукурузу, люцерну и табак для получения рекомбинантного апротинина для коммерческих целей.

### **Перспективы создания растительных («съедобных») вакцин на основе генетически модифицированных растений**

Идея использования клеток растений для наработки рекомбинантных антигенов впервые успешно реализована в

1992 г. группой исследователей под руководством Ч. Арнтзена (Mason et al., 1992). В их работе установлено, что поверхностный HBsAg-антиген вируса гепатита В не только накапливается в тканях трансгенных растений табака, но и способен к самосборке в вирусоподобные частицы размером около 22 нм. Такие частицы были идентичны рекомбинантным вирусоподобным частицам HBsAg-антигена, выделенным из промышленной рекомбинантной вакцины на основе дрожжей, а также вирусоподобным частицам из плазмы крови больных вирусом гепатита В. На основании полученных данных стало очевидным, что чужеродные белки способны синтезироваться в клетках трансгенных растений в их природной иммунологически активной форме. Это открывало новые возможности использования растений как более дешевых систем экспрессии для создания рекомбинантных вакцин.

Следующим принципиальным шагом в разработке концепции «съедобных» вакцин на основе генетически модифицированных растений были работы по созданию трансгенных растений картофеля, продуцирующих термолabileный энтеротоксин из *E. coli* (Haq et al., 1995; Mason et al., 1998) и В-субъединицу холерного токсина (Arakawa et al., 1998).

Термолabileный энтеротоксин *E. coli* состоит из двух частей: LT-A (фермент) и LT-B (пентамер из рецептор-связывающих полипептидов). LT-B взаимодействует с рецепторами ганглиозидов на поверхности мембраны эпителиоцитов тонкого кишечника млекопитающих и транспортирует LT-A в клетки кишечника. В эпителиоцитах LT-A вызывает изменение клеточного метаболизма и обезживание клеток. Если обе части термолabileного энтеротоксина отделить друг от друга, то презентация LT-B белкового комплекса на поверхности эпителиоцитов будет стимулировать сильный иммунный ответ слизистой оболочки кишечника без проявления каких-либо признаков заболевания. Именно эта особенность положена в основу исследований группы Ч. Арнтзена (Haq et al., 1995) по созданию «съедобных» вакцин. В их работе установлено, что LT-B, синтезируемый в трансгенных растениях табака и картофеля, а также LT-B, выделенный из *E. coli*, вызывают однотипные иммунные реакции у мышей.

В дальнейшем LT-B-последовательность была оптимизирована для экспрессии в растительных клетках и перенесена в геном растений картофеля (Mason et al., 1998). В клубнях картофеля белок корректно собирался в олигомеры и накапливался в достаточно больших количествах. На основании клинических испытаний рекомбинантной LT-B-вакцины показано, что поедание добровольцами сырых клубней картофеля, содержащих 0.3–10 мг LT-B, приводило к образованию мукозных и системных антител с высокими титрами (Tacket et al., 2000).

Опираясь на проведенные исследования, можно заключить, что «съедобные» вакцины на основе трансгенных растений способны вызывать защитный иммунитет и открывают новые возможности на пути создания недорогих и простых в обращении вакцин против инфекционных болезней животных и человека. По данным (Yusibov, Rabin-dran, 2008; Yusibov et al., 2011), около шести антигенов и антител (для пассивной иммунизации), синтезированных

в генетически модифицированных растениях, достигли первой и второй фаз клинических испытаний.

Механизм иммунизации «съедобными» вакцинами основан на антигенпредставляющей способности перитонеальных макрофагов тонкого кишечника млекопитающих. В кишечнике чужеродный белок, обладающий антигенными свойствами, распознается специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках). В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хелперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Дифференцированные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентральные лимфатические узлы, где происходит их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие специфические антитела. Плазматические клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. Секреторные иммуноглобулины IgA транспортируются на поверхность слизистых оболочек, где они связываются с чужеродными антигенами и препятствуют их проникновению в организм. Следует отметить, что мукозная вакцинация стимулирует как иммунный ответ слизистых оболочек – первого защитного барьера на пути патогенных агентов, так и общий иммунный ответ организма. Описана работа по изучению иммуногенности «съедобной» вакцины на основе трансгенных растений томатов, экспрессирующих HBsAg-антиген вируса гепатита В (Schelkunov et al., 2006). Показано, что при пероральном введении мышам гомогената плодов трансгенных растений томатов уровень антител в сыворотке крови возрастал после второго кормления и оставался высоким до конца эксперимента. Мукозный иммунный ответ формировался после первого кормления и оставался высоким в течение всего эксперимента.

К настоящему времени созданы трансгенные растения на основе многих видов, таких как табак, томаты, салат-латук, *A. thaliana* и турнепс, в которые перенесены гены, контролирующие синтез различных антигенов и антител. В некоторых случаях антигены «сшиваются» с другими белками для упрощения процедуры детекции продуктов целевого гена, например с геном β-глюкуронидазы (*uidA*). По активности фермента β-глюкуронидазы можно легко определить уровень накопления целевого антигена в тканях генетически модифицированного растения.

## Закключение

Растения используются человечеством для медицинских целей уже многие тысячи лет. Однако только в начале 21-го века с помощью методов генетической инженерии стало возможным создавать новые типы растений, в тканях которых могут синтезироваться и накапливаться белки из различных гетерологичных систем. Созданы трансгенные растения, в ядерный и хлоропластный геномы которых перенесены гены, контролирующие синтез белков, важных в терапии различных заболеваний. Благодаря

развитию методов генетической инженерии за последние 20 лет открылись перспективы в области создания вакцин нового поколения. Возможность изолировать гены патогенных вирусов и бактерий, а также манипулировать ими и переносить в геномы других организмов (например, в геномы растений) привела к созданию генетически модифицированных организмов, у которых накапливаемый в тканях белок-антиген служит лишь «опознавательным знаком» патогена и не способен вызывать болезнь. В настоящее время более десятка зарубежных фирм используют растительные системы экспрессии для наработки рекомбинантных белков, в том числе и белков-антигенов различных возбудителей инфекционных заболеваний.

## Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2016-008.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Almaraz-Delgado A.L., Flores-Urbe J., Perez-Espana V.H., Salgado-Manjarrez E., Badillo-Corona J.A. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Express*. 2014;4:57. DOI 10.1186/s13568-014-0057-4. PMID:25136510.
- Apeler H., Peters J., Schroder W. Expression, purification, and pharmacological characterization of a recombinant aprotinin variant. *Drug Res*. 2004;54(8):483-497. DOI 10.1055/s-0031-1297003.
- Arakawa T., Chong D.K.X., Langridge H.R. Efficacy of food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat. Biotechnol*. 1998; 16:292-297. DOI 10.1038/nbt0398-292.
- Boynton J.E., Gilham N.W., Harris S.E. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*. 1988; 240:1534-1538. DOI 10.1126/science.2897716.
- Casteleijn M., Richardson D. Engineering cells and proteins – creating pharmaceuticals. *Eur. Pharm. Rev*. 2014;19(4):12-19.
- Cox K.M., Sterling J.D., Regan J.T. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat. Biotechnol*. 2006;24:1591-1597. DOI 10.1038/nbt1260.
- Daniell H. Transgenic containment by maternal inheritance: effective or elusive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;1104:6879-6880. DOI 10.1073/pnas.0702219104.
- Daniell H., Chebolu S., Kumar S., Singleton M., Falconer R. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine*. 2005;23:1779-1783. DOI 10.1016/j.vaccine.2004.11.004.
- DeCosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol*. 2001;19:71-74. DOI 10.1038/83559.
- Desai P.N., Shrivastava N., Padh H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnol. Adv*. 2010;28:427-435. DOI 10.1016/j.biotechadv.2010.01.005.
- Dufourmantel N., Pelissier B., Garçon F., Peltier G., Ferullo J.M., Tissot G. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol. Biol*. 2004;55:479-489. DOI 10.1007/s11103-004-0192-4.
- Fischer R., Schillberg S., Hellwig S., Twyman R.M., Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol. Adv*. 2012;30:434-439. DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.08.007.
- Franklin S.E., Mayfield S.P. Prospects for molecular farming in the green algae *Chlamydomonas*. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2004;7:159-165. DOI 10.1016/j.pbi.2004.01.012.
- Gelvin S.B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2003;67(1):16-37. DOI 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003.

- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*. 2005;23:2042-2048. DOI 10.1016/j.vaccine.2005.01.006.
- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007;18:134-141. DOI 10.1016/j.copbio.2007.03.002.
- Haq T.A., Mason H.S., Clements J.D., Arntzen C.J. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*. 1995;268:714-719. DOI 10.1126/science.7732379.
- Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M., Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.* 2004;22:1415-1422. DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.08.007.
- Howard J.A. Commercialization of biopharmaceutical and bioindustrial proteins from plants. *Crop Sci.* 2005;45:468-472. DOI 10.2135/cropsci2005.0468.
- Huang T.-K., McDonald K.A. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem. Eng. J.* 2009;45:168-184. DOI 10.1016/j.bej.2009.02.008.
- Kaldis A., Ahmad A., Reid A., McGarvey B., Brandle J., Ma Sh., Jevnikar A., Kohalmi S.E., Menassa R. Highlevel production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnol. J.* 2013;11:535-545. DOI 10.1111/pbi.12041.
- Lelivelt C., McCabe M., Newell C. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 2005;58:763-774. DOI 10.1007/s11103-005-7704-8.
- Magnuson N.S., Linzmaier P.M., Reeves R., An G., Hay-Glass K., Lee J.M. Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr. Purif.* 1998;13:45-52. DOI 10.1006/prep.1998.0872.
- Martinez C.A., Guilietti A.M., Talou R. Research advances in plant-made flavivirus antigens. *Biotechnol. Adv.* 2012;30:1493-1505. DOI 10.1016/j.biotechadv.2012.03.004.
- Mason H.S., Haq T.A., Clements J.D., Arntzen C.J. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B-gene. *Vaccine*. 1998;16:1336-1343. DOI 10.1016/S0264-410X(98)80020-0.
- Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89: 11745-11749.
- Nagels B., Weterings K., Callewaert N., van Damme E.J.M. Production of plant made pharmaceuticals: from plant host to functional protein. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2012;31:148-180. DOI 10.1080/07352689.2011.616075.
- Permyakova N.V., Uvarova E.A., Deineko E.V. State of research in the field of the creation of plant vaccines for veterinary use. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2015;62(1):23-38. DOI 10.1134/S1021443715010100.
- Reinsing S., Lang D., Knight C. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*. 2008;319:64-69. DOI 10.1126/science.1150646.
- Reski R., Parsons J., Decker E.L. Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant Biotechnol. J.* 2015;13(8):1191-1198. DOI 10.1111/pbi.12401.
- Rosales-Mendoza S. *Algae-Based Biopharmaceuticals*. Springer, 2016. DOI 10.1007/978-3-319-32232-2.
- Rosales-Mendoza S., Tello-Olea M.A. Carrot cells: a pioneering platform for biopharmaceuticals production. *Mol. Biotechnol.* 2015;57: 219-232. DOI 10.1007/s12033-014-9837-y.
- Rybicki E.P. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8:620-637. DOI 10.1111/j.1467-7652.2010.00507.x.
- Schelkunov S.N., Salyaev R.K., Pozdnyakov S.G., Rekoslavskaya N.I., Nesterov A.E. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnol. Lett.* 2006;28(13):959-967. DOI 10.1007/s10529-006-9028-4.
- Schiermeyer A., Schillberg S. Plant molecular pharming – pharmaceuticals for human health. *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Ed. R.A. Meyers. N. Y.: Springer, 2012;8126-8141.
- Schillberg S., Raven N., Fischer R., Twyman R., Schiermeyer A. Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19:5531-5542.
- Sourrouille C., Marshall B., Lienard D., Faye L. From Neanderthal to nanobiotech: From plant potions to pharming with plant factories. Ed. L. Faye, V. Gomord. *Methods in Molecular Biology: Recombinant Proteins From Plants*. Humana Press, a part of Springer Science+Buisness Media, 2009;1-23. DOI 10.1007/978-1-59745-407-0\_1.
- Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Estes M.K., Arntzen C.J. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* 2000;182:302-305. DOI 10.1086/315653.
- Taunt H., Stoffels L., Purton S. Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. *Bioengineered*. 2017. DOI 10.1080/21655979.2017.1377867.
- Tekoah Y., Shulman A., Kizhner T., Ruderfer I., Fux L., Nataf Y., Bartfeld D., Ariel T., Gingis-Velitski S., Hanania U., Shaaltiel Y. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture – the protalix experience. *Plant Biotechnol. J.* 2015;13:1199-1208. DOI 10.1111/pbi.12428.
- Tiwari S., Verma P.C., Singh P.K., Tuli R. Plants as bioreactors for the production of vaccines and antigens. *Biotechnol. Adv.* 2009;27:449-467. DOI 10.1016/j.biotechadv.2009.03.006.
- Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 2003;21:570-578. DOI 10.1016/j.tibtech.2003.10.002.
- Weise A., Altmann F.M., Rodriguez-Franco M. High level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* delta-fuc-t and delta-xyl-t mutant. *Plant Biotechnol. J.* 2007;5:389-401. DOI 10.1111/j.1467-7652.2007.00248.x.
- Yusibov V., Rabindran S. Resent progress in the development of plant-derived vaccines. *Expert Rev. Vaccin.* 2008;7:1173-1183. DOI 10.1586/14760584.7.8.1173.
- Yusibov V., Streatfield S., Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals. *Hum. Vaccin.* 2011;7(3):313-321. DOI 10.4161/hv.7.3.14207.