

## ТЕХНОЛОГІЇ СТВОРЕННЯ РОСЛИННИХ ВАКЦИН

Саламашенко А.С., здобувач вищої освіти ОП «Ветеринарна медицина»  
Науковий керівник – Гарагуля Г.І., к.в.н., доцент  
*Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна*

**Актуальність.** Навантаження на імунну систему тварин зростає в зв'язку із збільшенням кількості щеплень. Вартість дозування вакцин для інфекційних хвороб тварин має бути мінімальною, особливо для нелетальних хвороб, які знижують добробут тварин і їх розвиток, тому ефективне та економічне виробництво, зберігання та доставка є критичними для комерціалізації нових видів вакцин. Саме тому рослинні вакцини привернули увагу дослідників та інвестиції компаній.

Використання рослин як біофабрик розпочалося майже 30 років тому. Сучасні технології генної інженерії рослин використовують для конструювання різних антигенів, наприклад, антигенів для субодничних вакцин, вірусоподібних частинок (VLP) та химерних VLP. В останні роки використання рослин як біореакторів стало захоплюючою сферою досліджень, і значні досягнення створили нові можливості.

Метою нашого дослідження був пошук, вивчення та аналіз літературних даних щодо технології вакцин, отриманих за допомогою генетично модифікованих рослин.

Робота виконувалась в лабораторії кафедри епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету м. Харків. Об'єкт досліджень – теоретичні засади технології рослинних вакцин для використання у ветеринарній медицині.

Дослідження проводили з жовтня 2023 по лютий 2024 року. Всього знайдено, вивчено і проаналізовано більше 50 статей виключно зарубіжних авторів.

Технологія створення будь-якої вакцини включає кілька етапів. При розробці рослинних вакцин основні з цих етапів такі: вибір антигену та платформи для його синтезу, вибір методу генетичної модифікації рослинних клітин, отримання антигену, його очистка, визначення способу використання та вивчення ефективності імунної відповіді. Ми зосередилися на розгляді тих етапів, що пов'язані з використанням рослин та культур рослинних клітин [1-5].

Важливою проблемою є питання вибору антигену. Експериментальні антигени, для яких захисна ефективність була продемонстрована на доклінічному або клінічному рівні, були обрані для виробництва в рослинах як потенційний недорогий варіант платформи. Крім того, антигени також можна відібрати за допомогою імуноінформаційних (*in silico*) підходів, таких як зворотна вакцинологія, використовуючи обчислювальні сервери та програмне забезпечення, яке передбачає потенційну імуногенність даного білка патогена.

Наступний етап – вибір технології інкапсуляції вакцинних антигенів в клітини рослин. Рослинні клітини, які використовуються як платформи для виробництва антигенів, забезпечують природну біоінкапсуляцію *in vivo*, яка витримує проходження через шлунок і вивільняє антигени в кишечнику завдяки присутності мікробів, здатних перетравлювати клітинну стінку. Білки також можуть бути інкапсульовані в субклітинні компартменти (наприклад, органели рослинних клітин), які забезпечують стабільність і активність, часто надаючи додаткові імуномодуючі ефекти. Нарешті, включення антигенів вакцин у наночастинки рослинного походження (вірусоподібні частинки, VLP). VLP надзвичайно універсальні, бо дозволяють відображати епітопи цільових антигенів [4].

У разі розробки субодничних вакцин використовують кілька підходів, а саме: експресія повного антигенного вірусного білка (зазвичай поверхневих білків збудників), експресія епітопів антигенів (фрагментів вірусних білків, розпізнаних імунною системою) або експресія вірусоподібних частинок (VLP) чи химерних VLP. Химерні VLP мають важливі переваги: вони мультивалентні, тобто складаються з антигенів різних патогенів і

навіть здатні включати функціональні сегменти РНК. Крім того, деякі епітопи химерних VLP можуть служити ад'ювантами для інших антигенів.

Різноманітні види рослин були генетично модифіковані для накопичення вакцинних антигенів для здоров'я людей і тварин. Для комерційного виробництва рекомбінантного білка були використані ряд рослин, включаючи картоплю, кукурудзу, рис, салат і сою. Однак тютюн і люцерна частіше використовуються через їхню високу біомасу, врожайність насіння та короткий життєвий цикл. Насіння може бути привабливим завдяки своїй стабільності при тривалому зберіганні порівняно з іншими рослинними матеріалами.

Було також показано, що трансгенна картопля є чудовою системою експресії. Серед антигенів, що виробляються в картоплі, лабільна В-субодиниця токсину ентеротоксигенної *Escherichia coli* і капсидний білок вірусу Norwalk були багатообіцяючими кандидатами в клінічних випробуваннях. Іншою цікавою культурою, яка використовується для виробництва вакцин, є помідори, які були генетично модифіковані для виробництва вакцини проти сказу.

Методи генетичної трансформації рослин створили основу розробки для широкого числа процедур трансформації, які сьогодні застосовуються для різних дизайнів вакцин, вироблених у рослинах (цілісному організмі, певній тканині, в рослинних культурах клітин), а також у клітинах мікроводоростей. Стало зрозуміло, що трансгенні рослини є економічною та ефективною альтернативою ферментації для великомасштабного виробництва вакцинних антигенів. Пероральна доставка рослинних вакцин є особливо привабливою, оскільки можна уникнути дорогого етапу очищення, додатково зменшуючи вартість однієї дози [2].

Існує кілька технологічних рішень для отримання генетично модифікованих рослин, які продукують рекомбінантні антигени. Дослідження останніх років дозволили розробити методи генетичної трансформації рослин для отримання гетерологічних білків у клітинах рослин. Основні методи генетичної модифікації рослин – трансформація ядра, тимчасова ядерна експресія та перетворення хлоропластів. Першим випробували метод ядерної трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, а пізніше – метод трансформації за допомогою хлоропласту [3].

Трансформація ядра рослинної клітини (або стабільне ядерне перетворення) була розроблена чотири десятиліття тому і в основному була досягнута шляхом трансфекції *Agrobacterium tumefaciens*. У цьому методі потрібну ДНК клонують у бінарну плазмиду. Потім плазмиду, що містить транскрипційну одиницю антигену, вводять в *A. tumefaciens*, як правило, шляхом електропорації. Далі агробактерію, що містить плазмиди, спільно культивують із фрагментами листя або стебла рослини з наступною повною регенерацією трансгенної рослини за допомогою процесів органогенезу або ембріогенезу. Нарешті, трансгени та білки можуть бути виявлені в повністю регенованих рослинах для підтвердження генетичної трансформації та експресії антигену.

Спочатку модельна рослина *Nicotiana tabacum* була основною рослиною для виробництва вакцини, пізніше використовували багато інших рослин для виробництва вакцини, наприклад, салат і морква, які мають переваги для пероральної форми вакцини. У ядерній трансформації плазмиди містять фрагмент, який генетично рекомбінується з ядерним геномом рослини. Для виходу більшої кількості білка-антигену можна збільшити кількість вірусних генетичних елементів у використаній генетичній конструкції.

Перехідна ядерна трансформація – це підхід тимчасової ядерної експресії, коли трансформовані рослинні клітини повинні зберігатися протягом короткого періоду (від двох до 10 днів). У цьому випадку інтеграція трансгену в ядерний геном не відбувається. Велику кількість копій генів доставляють в ядро, і вони здатні виробляти матричну РНК для високого виробництва рекомбінантного білка. Тимчасова трансформація може бути отримана різними стратегіями, де основним аспектом є «зараження» великої кількості рослинних клітин за допомогою будь-якого (або спільного) *Agrobacterium tumefaciens* або вірусних векторів, що містять антиген, що кодує ген. Перехідна та стабільна трансформація також може бути застосована до культури рослинних клітин або мікроводоростей, де

виробництво антигену може бути більш однорідним, а виробничі методи більш ефективними, особливо при культивуванні генетично модифікованих рослинних клітин.

Один із найвідоміших вірусних векторів, що використовуються для тимчасової експресії, був розроблений з використанням елементів РНК вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). В даний час доступний широкий репертуар типів вірусних векторів, і практично будь-який тип вірусу може бути використаний для розробки вектора експресії. Нещодавно вірус мозаїки бамбука з роду *Potexvirus* був використаний як вірусний вектор для отримання антигенів вірусу японського енцефаліту в рослинах. Механізм реплікації рухомого кола дозволяє доставляти реплікон (копії трансгенів) і може бути розроблений для виробництва більш ніж одного білка в рослинних клітинах.

Трансформація (перетворення) хлоропластів була генетичною модифікацією зеленої клітини, виконаною приблизно три десятиліття тому. Трансформація хлоропласту вперше була досягнута за допомогою наночастинок золота або вольфраму, які покривалися генетичним матеріалом, що містить мінімальні одиниці експресії генів, а потім вводяться в клітини-мішені для трансформації. Потрапивши в клітину, молекули ДНК можуть бути інтегровані в геном хлоропласта за допомогою механізмів рекомбінації ДНК. Проводили також трансформацію пластидних органел, які є в плодах і в бульбах. В даний час продукція антигену в хлоропласті має переваги, включаючи вищу продукцію рекомбінантного білка, ніж стабільна ядерна трансформація, яка визначається числом копій геномів хлоропласта в даній рослині. Таким чином, хлоропласт можна використовувати для виробництва білків для субодиночних вакцин. Однак хлоропласт не має механізму посттрансляційної модифікації, що є недоліком, коли посттрансляційно модифікований білок необхідний для виробництва вакцини.

Важливим аспектом при виготовленні вакцин у рослинах є утримання трансгенів. У цій сфері розглянуто різноманітні стратегії біостимування трансгенів, головними з яких є використання чоловічої стерильності в трансгенних рослинах, транспластомних рослинах, індукованих і тимчасових системах експресії та культурах рослинних клітин замість цілих рослин.

**Висновки.** Рослинна вакцинація розвивається. Майбутні зусилля мають бути спрямовані на перенесення експериментального успіху рослинних вакцин у клінічне застосування. Початкова концепція дешевих їстівних вакцин поступилася місцем усвідомленню того, що потрібні готові продукти, які цілком можуть бути ін'єкційними. Технологія довела свою цінність як засіб дешевого, легко масштабованого виробництва матеріалів: тепер їй потрібно знайти свою нішу в конкуренції з усталеними технологіями.

### **Бібліографічний список:**

1. Joensuu JJ, Niklander-Teeri V, Brandle JE. (2008) Transgenic plants for animal health: plant-made vaccine antigens for animal infectious disease control. *Phytochem Rev.* 2008;7(3):553-577. doi: 10.1007/s11101-008-9088-2. Epub 2008 Mar 8.
2. Monreal-Escalante E, Ramos-Vega A, Angulo C, Bañuelos-Hernández B. (2022) Plant-Based Vaccines: Antigen Design, Diversity, and Strategies for High Level Production. *Vaccines (Basel).* 2022 Jan 10;10(1):100. doi: 10.3390/vaccines10010100.
3. Rybicki EP. (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol J.* 2010 Jun;8(5):620-37. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00507.x. Epub 2010 Mar 11.
4. Schwestka J, Stoger E. (2021) Microparticles and Nanoparticles from Plants-The Benefits of Bioencapsulation. *Vaccines (Basel).* 2021 Apr 11;9(4):369. doi: 10.3390/vaccines9040369.
5. Sharma AK, Sharma MK. (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv.* 2009 Nov-Dec;27(6):811-832. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.004. Epub 2009 Jun 30.