

# ТРАНСГЕННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА «СЪЕДОБНОЙ» ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

## TRANSGENIC SYSTEMS FOR THE PRODUCTION OF AN «EDIBLE» VACCINE AGAINST HEPATITIS B VIRUS

**E. Smirnova  
R. Ivannikova  
V. Savinov**

*Summary.* Edible vaccines represent a promising area of scientific research that is exploring the possibility of using edible plants or products to deliver vaccines and stimulate the immune system. Such vaccines can provide a simpler and more affordable form of immunization, eliminating the problems associated with expensive and complex vaccine delivery methods. One example is a vaccine aimed at the prevention of hepatitis B, which many scientists have been developing and researching almost from the very beginning of the practical implementation of the idea of producing various proteins by transgenic plants. Hepatitis B is a very common and dangerous viral infection. Every year, 50 million cases of acute hepatitis B alone are recorded in the world. In this article, several studies have been conducted that confirmed the possibility of expressing hepatitis B virus antigens in transgenic systems, based on research, the relevance of using plants such as tomatoes and the fungus *Flammulina velutipes* to produce an «edible» vaccine, as well as its immunogenicity for the body, has been proven.

*Keywords:* «edible» vaccines, oral vaccines, food biotechnology, transgenic plants, hepatitis B virus vaccine, hepatitis B surface antigen.

**Смирнова Екатерина Александровна**

Московская Государственная академия ветеринарной  
медицины и биотехнологии МВА имени К.И. Скрябина  
e.smirnova.a@gmail.com

**Иванникова Регина Фановна**

Московская Государственная академия ветеринарной  
медицины и биотехнологии МВА имени К.И. Скрябина

**Савинов Василий Александрович**

ФГБНУ «Федеральный научный центр Всероссийский НИИ  
экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина  
и Я.Р. Коваленко РАН»

*Аннотация.* Съедобные вакцины представляют собой перспективную область научных исследований, которая изучает возможность использования съедобных растений или продуктов для доставки вакцин и стимулирования иммунной системы. Такие вакцины могут предоставить более простую и доступную форму иммунизации, устраняя проблемы, связанные с дорогими и сложными методами доставки вакцин. Одним из примеров является вакцина, направленная на профилактику гепатита В, разработкой и исследованием которой занимаются многие ученые практически с самого начала практической реализации идеи выработки трансгенными растениями различных протеинов. Гепатит В — очень распространенная и опасная вирусная инфекция. Каждый год в мире фиксируется 50 млн заболевших только острой формой гепатита В. В настоящей статье представлен ряд исследований, который подтверждает возможность экспрессии антигенов вируса гепатита В, в трансгенных системах. На основании исследований доказана уместность использования таких растений как томаты и гриб *Flammulina velutipes* для выработки «съедобной» вакцины, а также ее иммуногенность для организма.

*Ключевые слова:* «съедобные» вакцины, пероральные вакцины, пищевая биотехнология, трансгенные растения, вакцина против вируса гепатита В, гепатит В, поверхностный антиген, биофарминга.

### Введение

Вакцины — одно из важнейших направлений для изучения на протяжении последних двухсот лет. Их разработка, создание и применение имеет огромную значимость для обеспечения коллективного иммунитета к опасным заболеваниям среди людей. Вакцины совершили почти чудеса в борьбе со многими инфекционными заболеваниями. Они поспособствовали тому, что натуральная (черная) оспа осталась лишь в истории, как вскоре то же самое может произойти и с полиомиелитом [3].

Одним из перспективных и быстро развивающихся направлений растительного «биофарминга» является использование трансгенных растений в качестве продуцентов съедобных вакцин нового поколения, создаю-

щих перспективу широкой и эффективной иммунизации населения.

Все съедобные вакцины относят к категории пероральных: они поступают в организм через желудочно-кишечный тракт, поглощаются М-клетками эпителиального слоя тонкого кишечника, после чего проникают в лимфоидный фолликул и взаимодействуют с антиген-презентирующими клетками [3], вызывая дальнейший мукозальный, так и общий системный ответ иммунной системы [4]. Однако основным отличием таких вакцин является способ их выработки и форма доставки — они синтезируются внутри генетически модифицированного растения, после поедания которого инициируется выработка антител [4].

Ключевую роль в процессе усвоения как съедобных, так и всех пероральных вакцин играют М-клетки (ми-

кроскладчатые клетки) фолликуло-ассоциированного эпителия, который покрывает люминальные поверхности Пейеровых бляшек. Эпителий в области Пейеровой бляшки содержит 5–10 % М-клеток. Эти клетки нередко называют иммунонаблюдательными постами в кишечном эпителии. М-клетки в отличие от соседних энтероцитов имеют уменьшенную цитоплазму из-за наличия базолатерального кармана. От апикальной мембраны к базолатеральной поверхности они транспортируют как неинфекционные частицы, так и паразитов, вирусы (полиовирусы, ВИЧ 3, норовирусы и реовирусы) и даже бактерии, включая *Brucella abortus*, *Salmonella Typhimurium* и *Yersinia enterocolitica* [5, 6].

Концепция съедобных вакцин представляет собой инновационный подход к доставке вакцин, цель которого — обеспечить безопасный и более доступный способ вакцинации. Подобная идея получила широкое распространение среди научного сообщества, и проводятся исследования по разработке различных методов доставки вакцин через растительные продукты питания, такие как помидоры [7], морковь [8], картофель [9] и другие.

#### Достоинства съедобных вакцин

Для подобного рода вакцинации не требуется специального образования и подготовки, высоко оценивается простота метода, его быстрота, экономия на привлечении квалифицированного персонала; он имеет потенциал быть более доступным и привлекательным для людей там, где нет доступа к стандартным методам вакцинации.

Вирусные гепатиты представляют группу инфекционных заболеваний печени, которые вызываются вирусами, принадлежащими к разным таксономическим группам. Одним из опасных и распространенных заболеваний является гепатит В, который может завершиться развитием острой печеночной недостаточности, хронического гепатита, цирроза печени и первичного рака печени (гепатоцеллюлярной карциномы). Отличается высокой устойчивостью во внешней среде. Вирус годами сохраняется в цельной крови и препаратах крови.

Программы иммунизации на основе ДНК для борьбы с распространением гепатита В в развивающихся странах являются дорогостоящими и требуют специального хранения и транспортировки. Альтернативным способом является экспрессия поверхностного антигена гепатита В (*HBsAg*) в растениях для разработки пероральных вакцин.

#### Цели исследования

Анализ данных литературных источников с целью изучения возможности синтеза «съедобных» вакцин против вируса гепатита В в трансгенных системах, изучение

вариабельности показателей их выделения и эффективности, а также влияния на организм вакцинируемого.

#### Материалы исследования

В работе использованы теоретические методы исследования, такие как: актуальный обзор и системный анализ статей зарубежных авторов из различных баз данных электронных библиотек, таких как PubMed, ScienceDirect, КиберЛенинка и др., а также индуктивное заключение.

#### Результаты и обсуждения

На данный момент создано и изучено на опытных моделях достаточное количество съедобных вакцин. Эти препараты являются иммуногенными, содержащими антигенные белки, а не патогены. Следовательно, они способны устранить возможность рецидива заболевания антигенными препаратами, содержащими организмы в любой форме. Экспрессия антигенов в виде вакцин в трансгенных растениях является удобным и недорогим источником для лечения различных бактериальных, вирусных и аутоиммунных заболеваний с меньшими капитальными затратами [10].

Международный коллектив авторов из Пакистана, США, Саудовской Аравии и Кореи (Сафина Инам, Захир Аббас, Сабахат Нур, Назия Рехман, и др.) при поддержке Университета короля Сауда (Эр-Рияд, Саудовская Аравия) в своем исследовании изучали экспрессию поверхностного антигена гепатита В (*HBsAg*) в растениях для разработки пероральных вакцин (2022 г.) [13]. Из 302 семядольных листьев только 26 семядольных листьев смогли выжить на селекционных средах и регенерированных растениях со средней эффективностью трансформации 8,58 %. В этом исследовании ген *HBsAg* был выделен, клонирован, а затем трансформирован в растениях томата. Трансгенные растения томата были подтверждены методом ОТ-ПЦР. Экспрессию *HBsAg* анализировали в зрелых зеленых и красных стадиях плодов томата с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Было замечено, что экспрессия *HBsAg* была выше в зрелом красном томате по сравнению со зрелым зеленым.

Были также сделаны выводы, что томаты могут быть использованы для производства иммуногенных белков против различных заболеваний по причине того, что их можно легко трансформировать, быстро производить и есть сырыми.

Аналогичное исследование было проведено российскими учеными Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск) А.С. Столбиковым, Н.И. Рекославской, Р.Е. Саляевым (2008 г.). Для экс-

перимента были взяты эксплантаты 2-недельные проростки томата сорта Вентура и модифицировали их с помощью агробактерии штамма LBA 4404, содержащей плазмиду pBINp35S-preS2-S-HDEL [7]. Целевой ген preS2-S кодирует 2 поверхностных полипептида оболочки гепатита В. Исследования показывают, что при совместной экспрессии генов S и preS2 иммунный ответ проявляется сильнее (Jilg, 1998; Joung et al., 2007), что говорит о возможности более эффективного действия вакцины при введении этих двух генов в геном растений. Сигнальная последовательность HDEL (гистидин-аспаратат-глутамат-лейцин) использовалась для большей стабильности и увеличения количества экспрессируемого антигена.

Успешность инсерции целевого гена в ядерный геном томата выявляли с помощью ПЦР анализа листьев и плодов растений, которые прошли селекцию на канамицине, а для выявления основного антигенного белка гепатита В в тканях трансформированных растений — иммуноферментный анализ (ИФА).

Полученные результаты позволили заключить, что данный метод генетической трансформации достаточно пригоден для растений томата. Эффективность трансформации составила 2,3 %. Результаты селекции на среде с канамицином подтвердили экспрессию гена *prt II* в трансгенных растениях. В итоге были получены вполне здоровые и жизнеспособные трансгенные растения, обладающие нормальным плодоношением, фенотипически не отличающиеся от контрольных не трансформированных растений.

Однако не только томаты применяются в экспериментах по созданию «съедобных» вакцин. Так, в совместной работе Ли-Синь Хуан, Хао Йе Линь, Ин-Цзы Лю, Цзяу-Лин Гун, Цзин-Цан Хуан — сотрудников компании MucosMagic Biotechnology Co. (Нью-Тайбэй, Тайвань) и научных сотрудников факультета биохимических наук и технологий Национального университета Тайваня (Тайбэй, Тайвань) — исследовалась возможность экспрессии поверхностных белков вируса гепатита В грибами *Flammulina velutipes* (2019 г.) [14].

Важной особенностью являлось то, что генетическая модификация должна происходить обязательно в обоих ядрах дикариотического мицелия этих грибов, иначе, если измененный ген находится лишь в одном ядре из двух, степень экспрессии белка снижается.

В этом исследовании стабильные трансгенные *F. velutipes* по HBsAg были получены путем модификации, опосредованной агробактериями, с последующим плодоношением и слиянием базидиоспор. Было выявлено, что специфическая иммуногенность обнаруживается у свиней после скармливания плодовых тел трансгенно-

го гриба *F. velutipes* в течение определенного периода времени.

Образование HBsAg было обнаружено с помощью вестерн-блот-анализа. Уровни экспрессии HBsAg в трансгенных плодовых телах *F. velutipes* составляли (129.3±15.1), (110.9±1.7) и (161,1±8,5) нг/г общего растворимого белка. Однако эти значения могут быть занижены из-за неполного добавления белка.

Ученые не остановились на достигнутом и приступили к этапу доклинических испытаний на свиньях, не содержащих специфических патогенов. Были использованы четыре самца и три самки, трехнедельного возраста, средней массой тела 19 кг. Двум самкам и двум самцам из экспериментальной группы скармливали по 9 г сухого трансгенного порошка из плодовых тел *F. velutipes* каждые 3 дня в течение 6 недель подряд, затем один раз в неделю в течение еще 14 недель подряд. По итогу уровень антител к вирусу гепатита В поднялся у двух из четырех подопытных животных: у одного самца (уровень специфических к HBsAg IgG достиг максимума в 14,9 мМЕ/мл на 14-й неделе, а затем снизился) и одной самки (уровни HBsAg составляли 9,75, 17,86 и 39,87 мМЕ/мл на 14, 18 и 20 неделях соответственно). В контрольной группе из трех оставшихся свиней изменения в уровне антител не произошли. На основании полученных данных ученые сделали вывод о возможности экспрессии грибами *F. Velutipes* патогенных белков, а также выработке IgG к вирусу гепатита В в животных системах.

Основываясь на изученных источниках и результатах зарубежных, так и отечественных исследований, можно сделать вывод о том, что итоги экспериментов Сафин Инам, Захир Аббас, Сабахат Нур и др. при поддержке Университета короля Сауда (Эр-Рияд, Саудовская Аравия), а также А.С. Столбикова, Н.И. Рекославской и Р.Е. Саляева (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск) подтверждают возможность внедрения гена поверхностного белка HBsAg вируса гепатита В в структуру генома растений и экспрессии «съедобной» вакцин против него трансгенной системой на примере томата. Стоит отметить, что между этими исследованиями заметна существенная разница в эффективности трансформации растений: в первом случае 8,58 % (2022 г.), во втором — 2,3 %. (2008 г.). Если брать во внимание даты проведения работ, то вероятнее столь резкий скачок в показателях мог произойти, например, по причине технологического усовершенствования используемого оборудования, или использовании другой культуры агробактерий. Ли-Синь Хуан, Хао Йе Линь и др. же доказали не только возможность экспрессии поверхностного белка HBsAg в системе трансгенных грибов *Flammulina velutipes*, но и получили положительные результаты в доклинических исследованиях на свиньях, что говорит о наличии иммунного ответа при упо-

требление «съедобной» вакцины животной системой, что доказывает иммуногенность этой вакцины против вируса гепатита В. Таким образом, на основании анализированных исследований и доводов ученых [7, 13, 14] подтверждается возможность экспрессии «съедобной» вакцины против вируса гепатита В в трансгенной системе, и с учетом оказания влияния на организм вакцинируемого и повышения титра антител, необходимо дальнейшее исследование применения препарата на других лабораторных животных.

### Заключение

Тревожная ситуация, сложившаяся в связи с распространением вируса гепатита В не только в нашей стране, но и в мире, вызванная многими причинами, в том числе и проблемами в области профилактики, стимулировала

исследования по созданию недорогих широкодоступных и эффективных вакцин. Получение трансгенных съедобных растений, несущих рекомбинантные антигены, является желательным вопросом при поиске экономических альтернатив производству вакцин. Полученные из исследований данные подтверждают их эффективность, а также простоту применения. Затраты на производство и распространение вакцины могут быть значительно снижены за счет распространения такого рода вакцин в бедных странах. Антигены, хранящиеся в клетках растений, будут устойчивы к изменениям температуры, что позволит преодолеть потребность в хранении в холодильнике. Кроме того, введение вакцины для съедобных растений может быть более легким, если оно не потребует использования одноразовых игл или другого специализированного оборудования и персонала.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Шевердин А.В. Создание и использование биотехнологий: история вопроса // Журнал российского права. 2012. № 6. С. 118–126.
2. Романова С.Г. Развитие биотехнологий в России // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2012. С. 8–19.
3. R. Langridge, W.H. (2000). Edible Vaccines. *Scientific American*, 283(3), 66–71. doi:10.1038/scientificamerican0900-66
4. Салаяев Юрий Константинович, Рекославская Наталья Игоревна, Столбиков Алексей Сергеевич, Третьякова Анастасия Валерьевна, Осипенко Семен Николаевич Растительные экспрессионные системы для создания пероральных вакцин против опасных инфекционных заболеваний // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. — 2017. — Т. 21. — С. 3–20.
5. Быков А.С., Караулов А.В., Цомартова Д.А., Карташкина Н.Л., Горячкина В.Л., Кузнецов С.Л., Стоногина Д.А., Черешнева Е.В. М-КЛЕТКИ — ОДИН ИЗ ВАЖНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ИНИЦИАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА В КИШЕЧНИКЕ // Инфекция и иммунитет. — 2018. — Т. 8. — №3. — С. 263–272. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-263-272
6. Быков Анатолий Сергеевич, Караулов А.В., Цомартова Д.А., Карташкина Н.Л., Горячкина В.Л., Кузнецов С.Л., Стоногина Д.А., Черешнева Е.В. М-клетки — один из важных компонентов в инициации иммунного ответа в кишечнике // Инфекция и иммунитет. 2018. №3.
7. Столбиков А.С., Рекославская Н.И., Салаяев Р.К. Получение растений томата, трансформированных геном preS2-S-HDEL, с целью разработки кандидатной съедобной вакцины против гепатита в // *Acta Biomedica Scientifica*. 2008. №2.
8. Лучакивская Ю.С., Кищенко Е.М., Василенко М.Ю., Симоненко Ю.В., Кучук Н.В. Получение трансгенных растений моркови (*Daucus carota* L.) экспрессирующих гены секреторных протеинов *Mycobacterium tuberculosis* // *Biotechnol. acta*. 2011. №6.
9. Дейнеко Елена Викторовна Генетически модифицированные растения продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2012. №2 (18).
10. Abeyundara Achala & Aponso Minoli & Silva Oshadie. (2017). A review on edible vaccines: A novel approach to oral immunization as a replacement of conventional vaccines. *International Journal of Food Science and Nutrition* 2455–4898. 2. pp.19–22.
11. Rybicki E.P. Plant-based vaccines against viruses. *Viol J*. 2014 Dec 3; 11:205. doi: 10.1186/s12985-014-0205-0. PMID: 25465382; PMCID: PMC4264547.
12. Scotti N., Rybicki E.P. Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2013 Feb;12(2):211–24. doi: 10.1586/erv.12.147. PMID: 23414411.
13. Inam S., Abbas Z., Noor S., Rehman N., Adeel Zafar S., Ramzan Khan M., Ali Kaimkhani Z., Al-Misned F., Shah M., Mahboob S., Muhammad Ali G. Isolation, cloning and transgenic expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in *Solanum lycopersicum* L. *Saudi J Biol Sci*. 2022 Mar;29(3):1559–1564. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.11.012. Epub 2021 Nov 16. PMID: 35280581; PMCID: PMC8913426.
14. Huang L.H., Lin H.Y., Lyu Y.T., Gung C.L., Huang C.T. Development of a Transgenic *Flammulina velutipes* Oral Vaccine for Hepatitis B. *Food Technol Biotechnol*. 2019 Mar; 57(1):105–112. doi: 10.17113/ftb.57.01.19.5865. PMID: 31316282; PMCID: PMC6600300.
15. Marcondes J., Hansen E. Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HBsAg. *Braz J Infect Dis*. 2008 Dec;12(6):469–71. doi: 10.1590/s1413-86702008000600004. PMID: 19287831.
16. Anirban Saha, Sukanya Halder, Navneet Kumar Giri. Edible Vaccines: Future and its Prospects. *International Journal of Ayurveda and Pharma Research*. 2015; 3(9): С. 36–44.