



Е.А. Уварова*, Е.В. Дейнеко*, С.Н. Щелкунов*

Сравнительный анализ иммуногенности трансгенной моркови, продуцирующей S или M антигены вируса гепатита В, при оральной иммунизации мышей

Гепатит В является одной из глобальных проблем здравоохранения. В настоящее время этим вирусом в мире инфицированы около двух миллиардов человек, несмотря на то что эффективная вакцина применяется около 20 лет.

Поверхностный антиген гепатита В был экспрессирован в нескольких системах. Применяющаяся в настоящее время вакцина производится в системе рекомбинантных дрожжей и вводится инъекционно. Это относительно дорогая вакцина, к тому же схема вакцинации требует обучения многочисленного персонала. И наконец, небольшая, но существенная часть вакцинируемых не защищается от ВГБ. Все это указывает на необходимость разработки новых вариантов вакцины против гепатита В, которые были бы эффективны, дешевы, безопасны и просты в использовании. Мукозальная вакцина может явиться такой альтернативой. Существует подход к созданию мукозальных вакцин, который состоит в получении трансгенных растений, продуцирующих протективные антигенные белки инфекционных агентов, и использовании их в качестве съедобных вакцин. Стенки клеток растений обеспечивают эффективную защиту находящегося в них антигена после поедания и прохождения через желудок. Поэтому «упакованный» в растительной клетке антиген эффективно достигает кишечника, в котором и представляется мукозальной иммунной системе. Важной особенностью таких съедобных вакцин является их потенциальная дешевизна.

Рекомбинантные белки, синтезированные в трансгенных растениях, заметно дешевле по сравнению с аналогичными белками, наработанными в других генно-инженерных системах, включая дрожжевую и бактериальную. В случае использования трансгенных растений в качестве съедобных вакцин не требуется выделения и очистки целевого белка, что дополнительно значительно снижает стоимость иммуногенного препарата. Другими привлекательными свойствами съедобных вакцин на основе трансгенных растений являются их биологическая безопасность (отсутствие в растениях вирусных патогенов человека), простота хранения (не требуется холодовая цепь) и применения (безыгольная

иммунизация), а также возможность получения новых комбинаций белков на основе реопыления (скрещивания) трансгенных растений.

Образование поверхностных вирионных белков ВГВ контролируется одним вирусным геном *env*, имеющим три стартовых кодона. Поэтому оболочка вириона ВГВ собирается из трех белков – короткого S (HBsAg), среднего M (preS2-HBsAg) и большого L (preS1-preS2-HBsAg). HBsAg является гликопротеином, который присутствует в зараженном организме не только в составе вирионов диаметром 42 нм, но и в виде сферических частиц диаметром 18–22 нм, образующихся в результате самосборки молекул HBsAg. Данные частицы S антигена, очищенные от других компонентов вируса, высокоиммуногенны и защищают человека от последующей вирусной инфекции. Обнаружено, что антитела против синтетических пептидов preS2 способны нейтрализовать ВГВ. Поэтому полагают, что вакцина на основе M (preS2-S) антигена может быть более иммуногенна по сравнению с классической на основе S антигена, и предпринимаются попытки создания вакцин против гепатита В на основе M антигена. При этом пока не проведено сравнения иммуногенных свойств S и M антигенов ВГВ при оральном применении в составе съедобных вакцин.

Целью настоящей работы явились создание трансгенных растений моркови, продуцирующих S или M антиген ВГВ, и сравнительное изучение их иммуногенности при кормлении мышей сырыми корнеплодами этих растений.

Для трансформации растений мы создали две конструкции. В первой S антиген был слит с сигналом, который позволяет переносить целевой белок в люмен эндоплазматического ретикулума. Вторая конструкция содержала только M антиген. В обеих конструкциях гены находились под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты в составе бинарного вектора pBINPLUS/ARS.

В работе использовали морковь (*Daucus carota* L.) сорта Нантская. Растения моркови были трансформированы с помощью агробактериальной трансформации, их выращивали на селективной среде с канамицином. Было

проанализировано 66 трансгенных растений, 27 из которых содержали конструкции *pre2S-S* и 39 с конструкцией *sigER-preS-2S-HDEL*. Наличие целевых генов подтверждали ПЦР. В результате анализа во всех 66 образцах обнаружен целевой фрагмент ожидаемого размера (285 п.н.).

Для оральной иммунизации мышей линии BALB/c использовали сырые корнеплоды трансгенной моркови, продуцирующей S (HBsAg) или M (preS2-HBsAg) антигены вируса гепатита В. Иммунизацию кормлением проводили трехкратно с интервалами в 2 недели между каждым кормлением. При анализе мононуклеарных клеток периферической крови мышей с 14-го дня эксперимента наблюдается формирование эффективного HBsAg специфического Т-клеточного иммунного ответа у всех животных, поедавших трансгенную морковь, продуцирующую как S, так и M антиген вируса гепатита В. Антитела против HBsAg в плазме крови обнаружены лишь у 11 % мышей при иммунизации морковью с S антигеном и не выявлены для моркови, продуцирующей M антиген. В кишечнике экспериментальных животных обнаружено появление антител против HBsAg в группах, получавших S антиген (28 % животных) и M антиген (11 %). Ни в одном из образцов крови или ки-

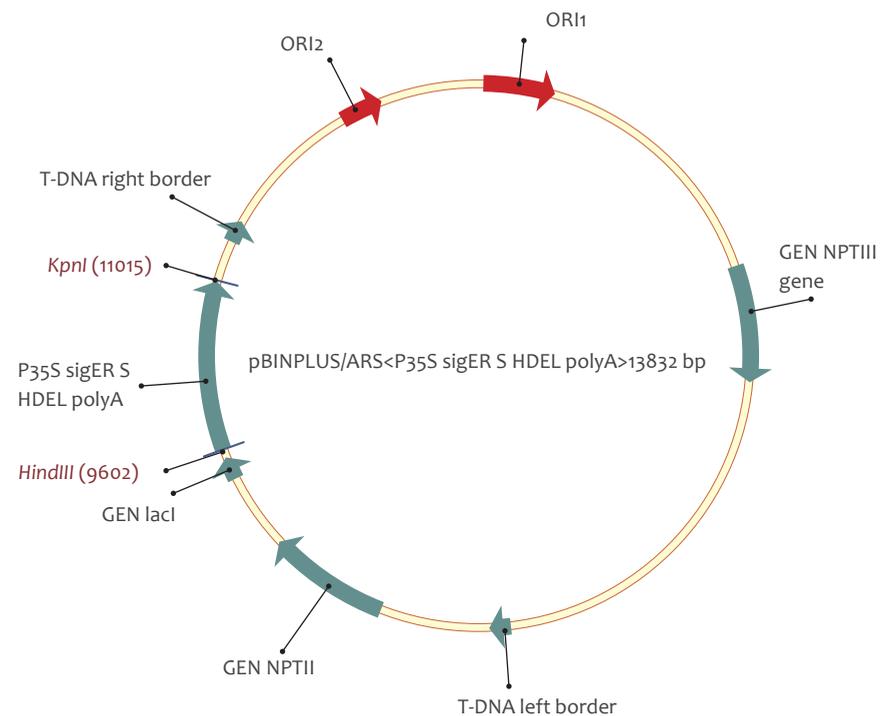


Рис. 1. Схема генетической конструкции, созданной для генетической трансформации растений.

шечника контрольных животных, поедавших исходную морковь или морковь со встройкой векторной Т-ДНК, антител против HBsAg обнаружено не было.

Важным результатом проведенного исследования является первая демонстрация того, что морковь, корнеплоды которой можно использовать в пищу без термообработки, может составить основу для создания съедобных противовирусных вакцин.

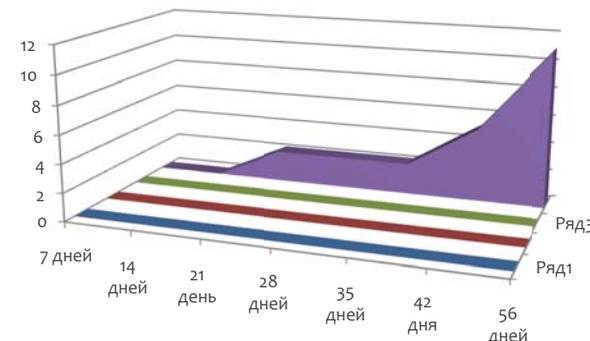


Рис. 2. Динамика обнаружения антител к HBsAg в периферической крови мышей. По оси абсцисс – процент (%) от общего числа животных в группе, в которой мы обнаружили антитела к HBsAg. По оси ординат – дни наблюдения.

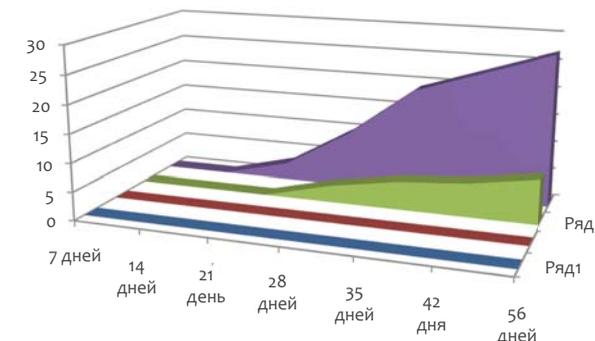


Рис. 3. Динамика обнаружения антител к HBsAg в содержимом кишечника мышей. По оси абсцисс – процент (%) от общего числа животных в группе, в которой мы обнаружили антитела к HBsAg. По оси ординат – дни наблюдения.

Работа выполнена при поддержке гранта МНТЦ № 2176р «Получение съедобных вакцин с использованием трансгенных растений».