

УДК 581.19:578.74

РЕКОМБИНАНТНЫЕ VLP-ВАКЦИНЫ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ В РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2024 г. С. М. Розов^{а, *}, Е. В. Дейнеко^{а, **}^аИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: rozov@bionet.nsc.ru

**e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Разработка и создание вакцин нового поколения на основе рекомбинантных белков, собирающихся в вирусоподобные частицы (virus-like particles, VLP), а также рекомбинантных белков в виде наночастиц — перспективные направления современной биотехнологии. За счет больших размеров (20–200 нм) и многократно повторенных антигенных детерминант рекомбинантные VLP-вакцины позволяют стимулировать сильные гуморальные и клеточные иммунные ответы. Кроме того, эти вакцины безопасны, так как не содержат чужеродного генетического материала. В обзоре рассмотрены типы VLP, а также особенности и недостатки экспрессионных систем, применяемых для их биосинтеза. Основной акцент сделан на растительные экспрессионные системы, обеспечивающие биосинтез целевого рекомбинантного белка с матрицы, интегрированной в ядерный или хлоропластный геном растения (стабильная экспрессия), либо с матрицы, предназначенной для временной наработки целевого продукта (транзистентная экспрессия). Рассмотрены различные пути увеличения выхода VLP-формирующих рекомбинантных белков, в том числе с использованием сигнальных пептидов, направляющих белок в хлоропласты. Также обсуждены перспективы использования специальных сигнальных последовательностей для транспорта VLP-образующих рекомбинантных белков и их накопления в других наночастицах — белковых тельцах.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, вирусоподобные частицы, растительные системы экспрессии, стабильная экспрессия, транзистентная экспрессия, VLP-вакцины

DOI: 10.31857/S0026898424030047, EDN: JDBSNP

ВВЕДЕНИЕ

Подавляющее большинство вакцин, используемых в настоящее время, получено классическими способами. Это либо инактивированные, либо живые аттенуированные патогены. Несколько особняком стоят вакцины, получаемые на основе

инактивированных токсинов микроорганизмов и формирующие антитоксический иммунитет. Хотя эти традиционные вакцины многие годы с успехом применяют против широкого круга инфекционных заболеваний, они не лишены недостатков, связанных в основном с низкой иммуногенностью [1]. Поразившая весь мир пандемия COVID-19 заставила научное сообщество задуматься о разработке новых вакцин, высокоэффективных и иммуногенных. Сейчас основная задача состоит в том, чтобы разработать новые технологические подходы, которые позволят повысить иммуногенность вакцин без ущерба для их безопасности и переносимости. Последние достижения в создании вакцин на основе ДНК, мРНК и рекомбинантных вирусных векторов — новое направление в борьбе с трудноизлечимыми и новыми инфекционными заболеваниями [2]. Активно разрабатываемая в настоящее время технология вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLP) представляет собой альтернативную платформу для разработки эффективных вакцин. Она основана на рекомбинантных антигенах,

Сокращения: VLP (virus-like particles) — вирусоподобные частицы; AIMV (alfalfa mosaic virus) — вирус мозаики люцерны; CCMV (cowpea chlorotic mosaic virus) — вирус хлоротичной пятнистости вьюн; CMV (cucumber mosaic virus) — вирус огуречной мозаики; CPMV (cowpea mosaic virus) — вирус мозаики вьюн; HBV (hepatitis B virus) — вирус гепатита В; HCV (hepatitis C virus) — вирус гепатита С; HPV (human papillomavirus) — вирус папилломы человека; MaMV (malt virus) — вирус мозаики ячменя; PapMV (papaya mosaic virus) — вирус мозаики папайи; PhMV (physalis mottle virus) — вирус пятнистой мозаики физалиса; PTM (post-translation modification) — посттрансляционные модификации; PVY (potato virus Y) — вирус Y картофеля; TEV (tobacco etch virus) — вирус увядания табака; TMV (tobacco mosaic virus) — вирус табачной мозаики; ОРБ — общий растворимый белок.

синтезируемых в различных системах экспрессии и способных собираться в VLP. Эта технология развивается параллельно с вакцинами на основе ДНК, мРНК и вирусных векторов [3]. VLP-вакцины гораздо более иммуногенны по сравнению с субъединичными, ДНК- и РНК-вакцинами, так как содержат многократно повторяющиеся антигенные эпитопы/детерминанты в правильной конформации, которые иммунная система эффективно распознает. Заметим, что низкая иммуногенность субъединичных вакцин часто обусловлена именно неправильной конформацией целевого антигена [4]. Кроме того, в случае субъединичных и мРНК- и ДНК-вакцин чаще всего необходимо введение в их состав адъювантов и проведение повторных вакцинаций для индукции протективного иммунного ответа [5].

Изначально, с середины XX века, термин “virus-like particles” использовали в вирусологии для обозначения видимых при электронной микроскопии частиц, которые предположительно были вирусами. С развитием биотехнологии этот термин приобретает новое значение: сейчас под VLP понимают частицы, лишенные вирусного генетического материала, состоящие только из капсидных и/или других вирусных белков [6]. Впервые VLP были получены в 1968 году в результате реассоциации белков оболочки вируса хлоротической крапчатости вигны (cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) [7]. В 1976 году были получены VLP на основе белков вируса мозаики папайи (papaya mosaic virus, PapMV) [8]. Платформа VLP позволяет решать различные проблемы, которые связаны с традиционными вакцинами: возможную реверсию к вирулентной форме аттенуированных штаммов патогенов, низкую иммуногенность, длительный период формирования иммунного ответа для инактивированных вакцин, — и обеспечить сильный иммунный ответ [9]. VLP — это мультимерные самособирающиеся комплексы одного или нескольких вирусных белков, которые образуют наночастицы размером 20–200 нм (в случае палочковидных или нитевидных вирусов длина может быть больше), по форме близкие к нативному вирусу, но лишенные его генетического материала и поэтому не способные к репликации [9]. VLP могут служить вакциной не только от вирусов, белки которых были использованы для их сборки, но также содержать иммуногенные эпитопы других патогенов. Для их получения используют методы конъюгации белков, слияния генов или химической модификации. Это так называемые химерные, или гибридные, VLP [9, 10]. Благодаря своим размерам VLP свободно проникают в лимфатические узлы и легко узнаются антигенпрезентирующими клетками, что повышает их иммуногенность по сравнению с другими вакцинами как на гуморальном, так и клеточном уровне [11]. Наличие множества копий антигена на их поверхности — еще один фактор, увеличивающий

эффективность VLP-вакцин. Кроме того, использование VLP в качестве вакцин гораздо безопаснее по сравнению с классическими и нуклеиновыми вакцинами, так как они не содержат генетического материала патогенов.

VLP могут быть синтезированы в различных экспрессионных системах, как прокариотических (*Escherichia coli*), так и эукариотических (дрожжи, клетки млекопитающих и насекомых, растения и их клеточные культуры). В представленном обзоре рассмотрены в основном VLP-вакцины, синтезируемые в растительных системах экспрессии. Растительные системы, по сравнению с другими, имеют ряд преимуществ.

Так как многие вирусные белки гликозилированы, а прокариоты не способны к посттрансляционным модификациям (post-translation modification, PTM), то для получения эффективных VLP-вакцин предпочтение отдают эукариотическим системам экспрессии. Паттерны гликозилирования у растений и животных сильно отличаются, поэтому для синтеза VLP предпочитают использовать гуманизированные растения или культуры их клеток [10]. Растительные системы экспрессии требуют значительно меньших материальных затрат, чем культуры клеток млекопитающих, легко масштабируются и лишены опасности контаминации патогенами человека и животных. Кроме того, вакцины на основе VLP вирусов растений, а также животных безопасны для окружающей среды в целом, так как лишены вирусного генетического материала. Проблемы низкого уровня экспрессии VLP в клетках растений и сайленсинга случайно встроенных в геном целевых генов в большинстве случаев могут быть решены в системах транзientной экспрессии с использованием репликонных систем вирусов растений: например, BeYDV-репликона [12, 13] и MagnICON [13, 14], созданных на основе вирусов желтой карликовости фасоли (bean yellow dwarf virus, BeYDV) и табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV) соответственно.

СТРУКТУРА И ТИПЫ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ

VLP образуются в результате самопроизвольного взаимодействия одного или нескольких белков вируса, образуя единую наноструктуру. VLP структурно похожи на вирусную частицу, но лишены вирусного генома или содержат только его фрагмент. Чаще всего VLP собираются в сферические, палочковидные или нитевидные структуры — в зависимости от вида формирующего их вируса. VLP, состоящие из одного белка, имеют относительно простое строение, в то время как мультибелковые VLP могут содержать два или даже три слоя, причем с разной структурой. Более сложные VLP, например на основе белков вируса иммунодефицита

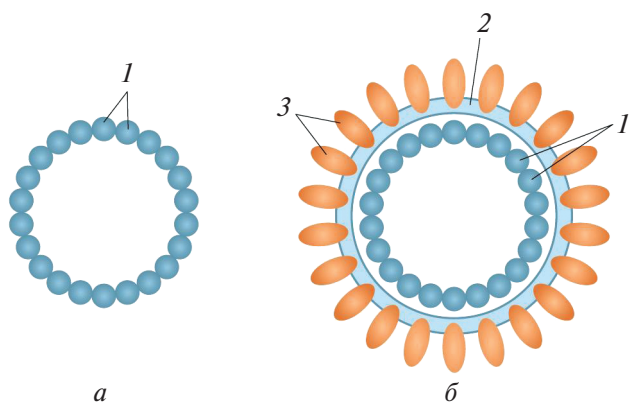


Рис. 1. Общая схема строения безоболочечных (а) и оболочечных (б) VLP. 1 — Структурный белок вируса, формирующий монобелковую VLP (если вирусных белков несколько, то они формируют мультibelковую VLP, в которой может быть уже несколько слоев); 2 — фосфолипидная мембрана, образованная из мембраны эндоплазматического ретикулума клетки-продуцента; 3 — вирусные мембранные или трансмембранные гликопротеины.

человека типа 1 (ВИЧ-1) или вируса гриппа, имеют внешнюю фосфолипидную мембрану, в которую встроены антигенные детерминанты поверхностных белков вируса. По этому признаку принято делить VLP на два типа: безоболочечные, состоящие только из вирусных белков, и оболочечные (eVLP), окруженные фосфолипидной мембраной, заимствованной у клетки-продуцента (рис. 1). Необходимость формирования у eVLP мембраны со встроенными вирусными гликопротеинами ограничивает выбор экспрессионных систем для их синтеза. Оба типа VLP могут нести эпитопы чужеродных антигенов, присоединенные к вирусным белкам тем или иным способом (конъюгация на уровне белков, слияние генов, химическая модификация) [15].

Безоболочечные VLP

Безоболочечные VLP состоят из множества молекул одного или 2–3 самособирающихся вирусных белков и не имеют фосфолипидной мембраны хозяина (рис. 1). Для их образования обычно достаточно экспрессии генов, кодирующих соответствующие белки, в используемой системе. Безоболочечные VLP до сих пор остаются наиболее привлекательной платформой для создания вакцин против многих патогенов, так как их легко получать и очищать [16]. Более того, безоболочечные VLP имеют значительно меньшие размеры, чем оболочечные, что позволяет им проходить через тканевые барьеры и проникать в лимфоузлы [17]. Безоболочечные VLP делятся на моно- и мультibelковые, а также на одно-, двух- и трехслойные. В качестве примера монобелковых VLP можно привести вакцины на основе вируса папилломы человека (human papillomavirus, HPV).

Единственный капсидный белок этого вируса можно экспрессировать как в прокариотических, так и в эукариотических системах. В некоторых случаях простые VLP могут быть сформированы в бесклеточной среде. В этом случае растворимый белок сначала нарабатывается в клетке, а затем выводится наружу, где собирается в VLP правильной конфигурации [18, 19].

Получение мультibelковых безоболочечных VLP — более трудная задача. Они чаще всего многослойные, со сложным взаимодействием мономеров друг с другом [20]. Эти VLP обычно синтезируются и собираются в эукариотических системах экспрессии, таких как дрожжи [21], клетки насекомых [22] и растений [23]. Разные белки мультibelковых VLP могут быть синтезированы и собраны в одной клетке. В качестве примера мультibelковых многослойных VLP можно привести синтезированные в клетках насекомых VLP на основе белков вирусов блятанг [24], энтеровируса-71 [25], полиовируса [26] и ротавируса [27]. Также мультibelковые VLP были получены из белков L1 и L2 HPV 16 типа (HPV-16) [28].

Оболочечные VLP (eVLP)

По сравнению с безоболочечными, eVLP имеют более сложное строение (рис. 1). У них есть внешняя фосфолипидная мембрана, происходящая из клетки-хозяина, с заякоренными в ней одним или несколькими вирусными гликопротеинами [29]. Эти поверхностные гликопротеины служат главными антигенами для образования нейтрализующих эти вирусы антител. Для формирования eVLP необходимо выполнение следующих условий: совместной экспрессии нескольких генов структурных белков вируса, сборки их в наночастицы в клетке и высвобождения последних наружу. Сборка кора VLP и приобретение фосфолипидной оболочки предположительно происходят в эндоплазматическом ретикулуме [30, 31]. К сожалению, минимальные компоненты, необходимые для образования eVLP, недостаточно хорошо изучены и варьируют от вируса к вирусу. Обычно их образование происходит в два этапа. Сначала из структурных белков вируса собирается кор VLP, который затем инкапсулируется мембраной, чаще всего происходящей из эндоплазматического ретикулума клетки-хозяина. На этом же этапе к образованной фосфолипидной мембране eVLP присоединяются вирусные гликопротеины, представляющие его основные антигенные детерминанты. Самосборка eVLP и выход их из клетки зависят как от структуры белков кора, так и гликопротеиновой оболочки вируса или от того и другого [32–34]. Так, для образования eVLP ретровирусов, например ВИЧ-1, достаточно экспрессии гликопротеина Gag, а в случае флавивирусов и коронавирусов — только гликопротеина оболочки [29].

Правильный фолдинг и гликозилирование поверхностных антигенов вируса в составе оболочечных eVLP-вакцин — чрезвычайно важные факторы для эффективного распознавания патогенов иммунной системой хозяина [35]. Например, мутантный вирус Зика, содержащий негликозилированный белок оболочки (Е), не вызывает у млекопитающих серьезного заболевания и индуцирует слабый иммунный ответ [36]. Показано, что гликозилирование белка Е — один из факторов патогенности вируса Денге (DENV) [37]. Поскольку eVLP имеют фосфолипидную мембрану, полученную от клетки-хозяина, они значительно более чувствительны, чем безоболочечные VLP, к условиям внешней среды. Так, температурные сдвиги, а также процессы выделения и очистки могут привести к нежелательным воздействиям на их структуру. В некоторых случаях eVLP подвергают модификациям, вводя в них мутации, повышающие устойчивость к повышенной температуре [38]. Наиболее известны eVLP вируса гриппа [39], ретровирусов [40] и вируса гепатита С (hepatitis C virus, HCV) [30]. Сконструированы eVLP вируса болезни Ньюкасла, которые формировались при одновременной экспрессии белков HN, F, NP и М в клетках птиц. Эти наночастицы структурно напоминали нативные вирионы, сохраняли функциональную активность ассоциированных с оболочкой гликопротеинов. Эффективность формирования этих eVLP составила 84%, что позволяет получать их в больших количествах, необходимых для производства вакцины [41].

Химерные VLP

Химерные VLP, наряду со структурными белками одного вируса, содержат еще белки или иммуногенные эпитопы других патогенов. Химерные VLP считают наиболее эффективным инструментом для разработки вакцин, которые обеспечивают широкую и мощную комплексную защиту от инфекционных заболеваний [42]. Такие сложные наноструктуры, содержащие иммуногенные эпитопы разных вирусов, могут быть сконструированы с использованием рекомбинантных векторов, содержащих как гены структурных вирусных белков, формирующих VLP, так и гены пептидов или белков других патогенов [43]. Химерные VLP имеют на своей поверхности множество сайтов, к которым методами генной инженерии или химической модификации могут быть присоединены антигены других вирусов [44]. Химерные VLP могут быть созданы как на основе безоболочечных, так и оболочечных вирусов. Несколько вакцин на основе химерных VLP уже проходят клинические испытания, включая вакцины против гепатита В (M2-HBcAg) и против малярии (MalariaVax) [29]. Также сконструированы вакцины против вируса гриппа A/Udorn/72 (H3N2) [43] и ВИЧ-1 [45, 46].

Химерные VLP-вакцины значительно более иммуногенны, чем субъединичные, и индуцируют сильный не только В-клеточный, но и Т-клеточный иммунные ответы, включая как CD4⁺, так и CD8⁺ лимфоциты [47].

Разработаны и проходят клинические испытания химерные VLP-вакцины, предназначенные для борьбы с неинфекционными заболеваниями. На основе бактериофага Q β созданы химерные VLP против артериальной гипертензии, рака, аллергического ринита, астмы, диабета, болезни Альцгеймера и даже от никотиновой зависимости [48, 49]. В экспериментах на животных продемонстрирована высокая эффективность вакцин против малярии [50, 51], некоторых онкологических [44, 51] и аутоиммунных заболеваний [49], болезни Альцгеймера [51, 52] и аллергических реакций [51]. Эти потенциальные вакцины, основанные на VLP вирусов растений: вируса огуречной мозаики (cucumber mosaic virus, CMV), вируса мозаики вигны (cowpea mosaic virus, CPMV) и TMV, — были высокоэффективны в экспериментах на животных [49–53].

ЭКСПРЕССИОННЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА VLP. РАСТИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ

Для производства VLP-вакцин могут быть использованы различные системы экспрессии — как прокариотические, так и эукариотические. У каждой платформы есть свои преимущества и недостатки; их выбор определяется строением и сложностью получаемых VLP, а также балансом между выходом продукта и стоимостью процесса наработки рекомбинантного белка [11]. Эукариотические системы включают *Baculovirus/insect cells* (B/IC) [29], культуры клеток млекопитающих [54] и растения или их клеточные культуры [23]. Правильный выбор экспрессионной системы — важнейший фактор обеспечения корректного фолдинга и РТМ белков, образующих VLP. Третичная структура VLP-формирующих вирусных белков и строение VLP могут различаться в разных экспрессионных системах из-за различий в гликозилировании и фосфорилировании, что влияет на иммуногенность вакцины, так как РТМ антигенов часто необходимы для стимуляции иммунного ответа [54].

Нерастительные экспрессионные системы: преимущества и недостатки

Бактерии, в основном *Escherichia coli*, относятся к широко используемым экспрессионным системам для получения VLP. Однако в связи с рядом факторов, таких как отсутствие системы РТМ, неправильное формирование дисульфидных связей и низкая растворимость синтезируемых

рекомбинантных белков, бактериальные системы не подходят для синтеза eVLP [16], хотя вполне удовлетворяют требованиям для получения безоболочечных VLP с одним или двумя структурными вирусными белками [54].

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* часто используют для синтеза VLP, так как они быстро растут, продуцируют высокие уровни рекомбинантных белков, производят некоторые РТМ, их культивирование не требует больших затрат и легко масштабируемо. Однако отсутствие метаболических путей для осуществления сложных РТМ, высокоманнозное гликозилирование, более низкий по сравнению с бактериальными системами экспрессии выход рекомбинантных белков и склонность к потере плазмид значительно ограничивают использование дрожжевой платформы для синтеза VLP [29]. Тем не менее в дрожжевых системах экспрессии получены эффективные VLP-вакцины, например против вируса гепатита В (hepatitis B virus, HBV). Несмотря на отличные от клеток млекопитающих паттерны РТМ, эта вакцина индуцировала высокий иммунный ответ [10].

Бакуловирусные системы экспрессии в культурах клеток насекомых (B/IC-системы) наиболее распространены для получения как безоболочечных, так и eVLP [29]. В этих системах уровни синтезируемых рекомбинантных белков сопоставимы с бактериальными и дрожжевыми платформами. В клетках насекомых происходят сложные РТМ и формируются мультибелковые VLP [55]. К основным недостаткам B/IC-платформы относятся более простые по сравнению с млекопитающими паттерны N-гликозилирования, что может быть неприемлемо для некоторых VLP, а также плохая масштабируемость и высокая стоимость по сравнению с бактериальными системами экспрессии. Следует подчеркнуть, что паттерны гликозилирования могут быть изменены введением в геном клеток насекомых гликозилтрансфераз млекопитающих [56].

Культуры клеток млекопитающих и птиц считаются идеальной платформой для производства как безоболочечных, так и eVLP-вакцин, но и они не лишены недостатков. Это, прежде всего, высокая стоимость, трудности с масштабированием и возможность загрязнения патогенами клеток-продуцентов [29]. Бесклеточные экспрессионные системы имеют ряд преимуществ по сравнению с клеточными платформами и позволяют быстро набирать требуемое количество VLP, не загрязненных клетками и клеточными компонентами. Но их коммерческое использование ограничено высокой стоимостью и плохой масштабируемостью [55, 57].

Растительные экспрессионные системы: преимущества и недостатки

Растительные системы экспрессии, как целые растения, так и их суспензионные клеточные культуры, обладают, по сравнению с другими экспрессионными платформами, рядом преимуществ. Это низкая стоимость производства и очистки рекомбинантных белков и VLP, возможность масштабирования, комплексное гликозилирование белков и отсутствие возможности контаминации патогенами млекопитающих. Современные технологии транзientной экспрессии, такие как MagnICON, BeYDV-репликон [12–14], Magniffection [58] и CPMV-НТ [59], основанные на репликациях вирусов растений, позволяют быстро, в течение нескольких суток, синтезировать в растениях до 5 г рекомбинантного белка на 1 кг сырой биомассы (до 80% общего растворимого белка) [58]. Общая схема растительных систем экспрессии, используемых для наработки рекомбинантных белков для получения VLP-вакцин, представлена на рис. 2.

Транзientная и ядерная системы экспрессии для наработки VLP-вакцин в растениях

Химерные или модифицированные вирусы растений, безопасные для животных и человека, широко используют в биотехнологии для создания вакцин. Более 50 вирусов растений в настоящее время служат основой для создания VLP и химерных вирусов, несущих на своей поверхности чужеродные антигены. Среди них TMV, CMV, вирус мозаики люцерны (AIMV), CPMV, CCMV, PapMV и X- и Y-вирусы картофеля (PVX и PVY соответственно). Химерные вирусы TMV, PVX, CPMV и CCMV оказались наиболее стабильными при высоких температурах и щелочных pH и могут быть получены в больших количествах в растениях-хозяевах [29, 60]. Показано, что CPMV и вирус легкой крапчатости перца (pepper mild mottle virus, PMMoV) высокостабильны в условиях пищеварительного тракта человека [61] и, следовательно, могут быть использованы для создания так называемых “съедобных” вакцин. Также многие вирусы растений используются или могут найти применение в дальнейшем для создания химерных VLP-вакцин [49, 62]. В табл. 1 представлены некоторые примеры такого использования растительных вирусов.

Помимо специфического иммунного ответа, вызванного присоединенными чужеродными антигенами, гибридные VLP на основе вирусов растений и целые модифицированные растительные вирусы способны вызывать сильные неспецифические иммунные реакции, то есть могут выступать в качестве сильных адъювантов. Этот эффект особенно важен при лечении неинфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Собственные антигены, расположенные на поверхности VLP вирусов растений, взаимодействуют

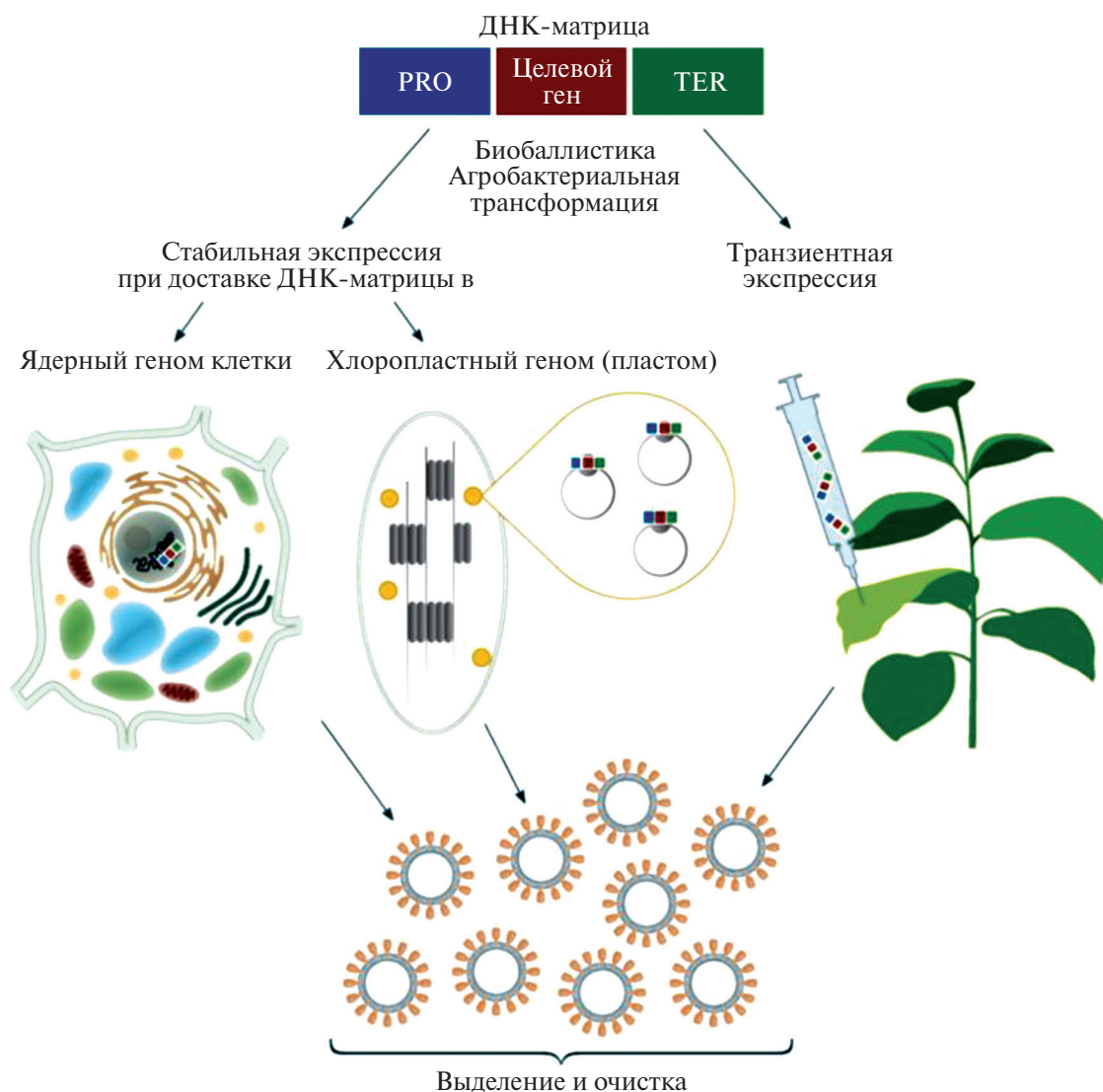


Рис. 2. Схема биосинтеза рекомбинантных VLP в растительной системе экспрессии. Обозначения: PRO – промотор, TER – терминатор.

с антигенпрезентирующими комплексами, что приводит к активации и увеличению числа нейтрофилов, макрофагов и дендритных клеток и, следовательно, к выработке широкого спектра интерлейкинов и хемокинов. Так, VLP на основе белков CPMV, как и исходный вирус, проявляют иммуномодулирующую активность, которая индуцирует регрессию опухоли [60]. За последние годы разработано более 100 экспериментальных вакцин, основанных на вирусах растений и их VLP. Они предназначены как для человека, так и для использования в ветеринарии и направлены против широкого круга заболеваний, включая онкологические, инфекционные и аутоиммунные [49–53]. В трех системах, использующих репликоны модифицированных вирусов растений (часть нежелательных или подлежащих контролю функций вируса передана другим компонентам экспрессионной системы), выявлено значительное усиление экспрессии

VLP вирусов растений при транзientной экспрессии. Это основанная на РНК-репликоне TMV система MagnICON [13, 14], на РНК-репликоне CPMV система CPMV-HT [59] и на ДНК-репликоне геминивирuсов система BeYDV [12, 13].

Растительные системы экспрессии также широко используют для получения VLP на основе вирусов животных и человека. VLP безоболочечного вируса Норволк (Norwalk virus, NV), этиологического агента гастроэнтерита, успешно синтезированные в стабильно трансформированных растениях томата, картофеля, табака и салата, имели структуру, сходную с нативным NV, реплицирующимся в клетках кишечника человека. Очищенные VLP проявляли высокую иммуногенность на мышинной модели. Однако в этих системах экспрессии синтез VLP NV проходил медленно и выход составлял менее 1% от общего растворимого белка (ОРБ), что

Таблица 1. Вирусы растений, используемые для создания кандидатных VLP-вакцин

VLP-формирующий вирус	Заболевание	Патоген	Антиген	Система экспрессии	Источник
AIMV	бешенство, гидрофобия	вирус бешенства	пептид Drg24 гликопротеина G (5–24 а.о.) и 31D-эпитоп	<i>Nicotiana benthamiana</i>	[63]
	ВИЧ-инфекция	ВИЧ-1	V3-домен белка gp120	<i>N. benthamiana</i>	[63]
	малярия	<i>Plasmodium falciparum</i>	белок Pfs25	<i>N. benthamiana</i>	[64]
	респираторная инфекция нижних дыхательных путей	респираторно-синцитиальный вирус	пептид G-белка (21 а.о.)	<i>E. coli</i>	[65]
CCMV	столбняк	<i>Clostridium tetani</i>	тетанотоксин	<i>E. coli</i>	[66]
	стрептококковая инфекция	<i>Streptococcus agalactiae</i>	пептид S9	<i>Pichia pastoris</i>	[67]
CPMV	стрептококковая инфекция	<i>Streptococcus agalactiae</i>	пептид S9	<i>P. pastoris</i>	[67]
	парвовирусный энтерит собак	парвовирус собак	пептид 3L17 белка VP2	<i>Vigna unguiculata</i>	[68]
PVY	гепатит В	HBV	эпитоп preS1	<i>E. coli</i>	[69]
	аллергия на кошек		аллерген кошек Fel d1	<i>E. coli</i>	[70]
MaMV ^a	грипп	вирусы гриппа А (H1N1 и H3N8)	M2e-пептид белка M2	<i>E. coli</i>	[71]
PhMV ^b	рак молочной железы		СН401-эпитоп белка HER2	<i>E. coli</i>	[72]
PapMV	гепатит С	HCV	эпитоп E2	<i>E. coli</i>	[73]
	грипп, пневмония	вирус гриппа и <i>Streptococcus pneumoniae</i>	некодирующая оцРНК	<i>E. coli</i>	[74]
	листериоз	<i>Listeria monocytogenes</i>	некодирующая оцРНК	<i>E. coli</i>	[75]
TMV	поражения кожи и слизистых у кроликов	папилломавирусы кролика CRPV/ROPV ^c	эпитопы белка L2	<i>N. benthamiana</i> <i>N. tabacum</i>	[76]
CMV	псориаз		IL-17 + Т-клеточный эпитоп титанотоксина	<i>E. coli</i>	[77]
	аллергия на кошек		Fel d1 + Т-клеточный эпитоп титанотоксина		
	болезнь Альцгеймера		Aβ _{1–6} -эпитоп β-амилоида + Т-клеточный эпитоп титанотоксина		
TEV ^d	репродуктивный и респираторный синдром свиней	PRRSV ^e	эпитопы белков GP3, GP4, GP5 и М	<i>E. coli</i>	[78]

^aвирус мозаики мальвы (malva mosaic virus);^bвирус пятнистой мозаики физалиса (physalis mottle virus);^cвирусы папилломы кролика (Cottontail rabbit papillomavirus) и оральной папилломы кролика (Rabbit oral papillomavirus);^dвирус увядания табака (tobacco etch virus);^eвирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (porcine reproductive and respiratory syndrome virus).

ограничивало их возможное использование в качестве вакцины. В системах транзientной экспрессии MagnICON и BeYDV удалось повысить выход этих VLP более чем в 80 раз и получить в листьях *Nicotiana benthamiana* через 12 суток после инфильтрации 0.86 мг/г сырой биомассы [13].

Транзientная экспрессионная система CPMV-НТ, основанная на репликоне CPMV, была использована для синтеза гетеромультимерных VLP вирусов гриппа А (H1N1 и H5N1) в листьях *N. benthamiana*. Показано, что в этой транзientной системе можно за несколько дней синтезировать в растении значительные количества VLP обоих штаммов вируса гриппа. Вирус гриппа оболочечный и содержит на поверхности вириона два белка: нейраминидазу (NA) и гемагглютинин (HA). Гликопротеин HA несет основные антигенные детерминанты вируса гриппа. Показано, что для создания сильного иммунного ответа достаточно присутствия на поверхности VLP белка HA. При транзientной экспрессии HA в *N. benthamiana* образовавшиеся VLP концентрировались в пространстве между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой, что облегчало их выделение. Авторами показано, что на платформе CPMV-НТ можно продуцировать в растении химерные VLP, несущие HA сразу нескольких штаммов вируса гриппа, что значительно расширяет спектр действия вакцины. Процесс легко масштабировать и получать за месяц столько доз вакцины, сколько другими конвенциональными методами достигается за год [79]. Эта же транзientная система была использована для создания VLP вируса птичьего гриппа А(H7N9); их высокая иммуногенность продемонстрирована на мышинной модели [80]. На базе транзientной платформы CPMV-НТ в листьях *N. benthamiana* получены VLP, сформированные четырьмя белками вируса африканской чумы лошадей (African horse sickness virus, AHSV). Протестирована способность этой вакцины вызывать сильный иммунный ответ на AHSV в экспериментах на морских свинках [81]. В последнее время для синтеза рекомбинантных белков и VLP в промышленных масштабах широко используют основанную на системе CPMV-НТ платформу транзientной экспрессии pEAQ-НТ, обеспечивающую высокий выход целевых продуктов [82].

Вирион HBV несет поверхностный белок HBsAg, способный формировать VLP. Ген, кодирующий HBsAg, перенесли в геномы картофеля, томата, люпина и салата и из биомассы этих растений выделили VLP HBsAg. Однако их выход был очень низким — микрограммы на грамм сырого веса, что недостаточно для дальнейшего их использования в качестве растительной вакцины. И только использование платформы транзientной экспрессии позволило повысить выход VLP HBsAg до 2 мг/г [60, 83]. Следовательно, этот подход можно считать перспективным для создания вакцины против гепатита В.

На основе AIMV и поверхностного белка Pfs25 малярийного плазмодия (*Plasmodium falciparum*) создана антималярийная вакцина Pfs25 VLP-FhCMB (Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology, США), транзientно нарабатываемая в листьях *N. benthamiana*; в ходе клинических испытаний продемонстрирована ее безопасность и высокая иммуногенность [50, 84]. Канадская биофармацевтическая компания “Medicago Inc.” разработала эффективную платформу транзientной экспрессии рекомбинантных белков в листьях *N. benthamiana* для получения VLP-вакцин против инфекций, вызванных вирусами гриппа, коронавирусами, ротавирусами и норовирусами [85]. Недавно компания сообщила о создании квадριвалентной VLP-вакцины, защищающей сразу от 4 штаммов сезонных вирусов гриппа. В ходе клинических испытаний этой вакцины выявлена высокая иммуногенность и сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ [86].

Этот же подход был использован для создания VLP-вакцины Covifenz (разработка Medicago in Canada & GlaxoSmithKline, UK) против SARS-CoV-2, содержащей рекомбинантный белок шипа (S), модифицированный для улучшения его стабильности и формирования VLP. S-белок образует тримеры, заякоренные в липидной оболочке VLP, сформированной из клеточной мембраны *N. benthamiana* [87]. Протективная эффективность вакцины Covifenz составляет 78.8% [88]. Другая VLP-вакцина против SARS-CoV-2, разработанная компанией “Kentucky Bioprocessing” (США), KBP-201, основана на VLP TMV и рецепторсвязывающем домене (receptor-binding domain, RBD) белка S. Оба компонента были совместно синтезированы в транзientной системе *N. benthamiana* и затем химически сшиты в процессе очистки. Для повышения стабильности вакцины KBD-201 последовательность RBD белка S была слита с Fc-доменом IgG1 человека, а также с пептидом экстенсина *N. benthamiana*, обеспечивающим секрецию рекомбинантного белка в апопласт [89]. В экспериментах на мышах показана протективная эффективность этой вакцины: около 100% при двукратном введении [90]. Серию SARS-CoV-2 VLP-вакцин разрабатывает компания “iBio, Inc.” (США): IBIO-200, IBIO-201 и IBIO-202. Вакцины основаны на полноразмерном S-белке с применением технологии FastFarming и транзientной системы экспрессии в *N. benthamiana* [91].

Вирус Зика (Zika virus, ZIKV) относится к семейству Flaviviridae, как и вирусы Денге (Dengue virus, DENV), Западного Нила (West Nile virus, WNV), клещевого энцефалита (tick-borne encephalitis virus, TBEV), японского энцефалита (Japanese encephalitis virus, JEV) и желтой лихорадки (yellow fever virus, YFV). Гликопротеин оболочки ZIKV (zE) состоит из трех доменов (EDI, EDII и EDIII) и отвечает

за сборку вируса, прикрепление к клеточным рецепторам и последующее слияние мембран при проникновении вируса в клетку. Гликопротеин zE также — основная мишень иммунного ответа хозяина [92]. Поскольку вирусы ZIKV и DENV генетически очень близки и эти инфекции совместно циркулируют в человеческой популяции, то вакцины против одной инфекции могут вызывать перекрестные реакции с другой и, как следствие, приводить к антителозависимому усилению инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE) второго возбудителя, что затрудняет создание вакцин [93]. Экспериментальная VLP-вакцина против ZIKV, основанная на структурном белке нуклеокапсида (coat protein, HBcAg) HBV, слитого с EDIII ZIKV (HBcAg–zEDIII), и транзientно экспрессируемая в *N. benthamiana*, индуцировала в мышах как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ. Важно, что эта вакцина не вызывала ADE по отношению к DENV [92]. Другая экспериментальная вакцина против ZIKV создана на основе VLP CMV, в состав которого введен эпитоп тетанотоксина *Clostridium tetani* и EDIII ZIKV. В экспериментах на мышах вакцина индуцировала высокие уровни ZIKV-нейтрализующих антител и не вызывала ADE при DENV-инфекции [94].

Экспериментальная VLP-вакцина против DENV, tHBcAg–сEDIII, транзientно синтезируемая в *N. benthamiana*, сконструирована на основе VLP HBV и EDIII DENV. Вакцина эффективна против 4 серотипов DENV. Для лучшего представления EDIII-эпитопа иммунной системе этот домен был встроен в иммунодоминантную область петли c/e1 HBcAg так, чтобы он оказался на шиповидных структурах собранных частиц. Иммунизация мышшей вызвала высокие титры антител к DENV через 4 недели после введения вакцины [95]. Другая кандидатная VLP-вакцина против DENV, транзientно синтезируемая в листьях *N. benthamiana*, основана на VLP, получаемых на основе полноразмерного белка E DENV. Продемонстрирована ее более высокая иммуногенность и эффективность по сравнению с VLP DENV EDIII [96].

Недавно были получены VLP TBEV, транзientно синтезируемые в *N. benthamiana* и основанные на вирусных белках С и рgМ-Е. Образование VLP подтвердили микроскопически и серологически, но в экспериментах на мышах, которым перорально вводили свежие листья *N. benthamiana* + VLP TBEV, не выявили никакого иммунного ответа. Скорее всего, отсутствие иммунной реакции связано с разрушением VLP в желудочно-кишечном тракте животных [97]. Однако такие же VLP TBEV, полученные ранее в клетках насекомых, были высокоиммуногенными при парентеральном введении и вызывали у мышшей образование антител к вирусу [98]. Экспериментальная VLP-вакцина против JEV была создана на основе VLP

вируса мозаики бамбука (BaMV) и EDIII JEV. Эти VLP транзientно нарабатывали в *N. benthamiana* и в листьях *Chenopodium quinoa*. Иммунизация мышшей этой вакциной приводила к выработке у них JEV-нейтрализующих антител [99].

Флавивирус WNV переносится птицами и комарами и широко распространен по всему миру [100]. Создано большое число кандидатных вакцин против WNV, в том числе две экспериментальные VLP: на основе рgМ-Е WNV (содержит полноразмерный вирусный белок Е) и химерная на основе HBV и EDIII WNV. Эти VLP-вакцины были транзientно синтезированы в листьях *N. benthamiana* и вызывали у мышшей сильный В- и Т-клеточный ответ [101, 102].

Распространенные в человеческой популяции штаммы HPV высокого онкогенного риска считаются основной причиной развития рака шейки матки у женщин. Основным белком капсида HPV, L1, способен к самосборке в VLP, морфологически подобные нативным вирионам и несущие на поверхности его основные антигены. Эти VLP могут индуцировать сильный иммунный ответ как В-, так и Т-клеток [103]. За последние годы получено множество кандидатных противораковых VLP-вакцин на основе белка L1 HPV-16 и HPV-11. Некоторые из них содержат либо модифицированный белок L1, либо несут дополнительные белки HPV, например L1Е6/Е7 или L1/Л2, либо содержат фрагменты белков других вирусов. Гены для синтеза этих VLP либо встраиваются в ядерный геном, либо транзientно экспрессируются в различных растениях: *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*. Наиболее полный список этих экспериментальных противораковых вакцин приведен в обзоре В. Shanmugaraj с соавт. [104].

Трансмембранный белок gp41 оболочки ВИЧ-1 играет важную роль в проникновении вируса через слизистые и инфицировании CD4⁺-клеток. Полипептид Gag — важный структурный компонент ВИЧ-1, который образует капсид и несет важные антигенные детерминанты вируса. Совместная экспрессия этих белков (полноразмерного Gag и модифицированного gp41, dgp41) — как стабильная ядерная, так и транзientная — в листьях *N. benthamiana* приводит к образованию оболочечных VLP, которые в дальнейшем могут служить основой для создания вакцины против ВИЧ-1 [105].

Другие методы получения белковых наночастиц в клетках растений для производства вакцин

Трансформация хлоропластов, по сравнению с ядерной, имеет целый ряд преимуществ. Прежде всего, за счет большого числа хлоропластных геномов (пластомов) — до 10000 на клетку (рис. 2) — она обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгенов, сопоставимый с методами транзientной

экспрессии, но который, в отличие от последних, стабилен. Трансформация хлоропластов происходит адресно по механизму гомологичного обмена, позволяет избежать инактивации трансгенов и дает возможность создавать искусственные опероны из нескольких белков. Кроме того, двойная мембрана хлоропласта защищает рекомбинатные белки от расщепления цитозольными протеазами, а наследование хлоропластов по материнской линии исключает вероятность переноса пыльной трансгенов на другие растения. В то же время неспособность посттрансляционного аппарата хлоропластов осуществлять гликозилирование может значительно снижать эффективность синтезируемых в них VLP-вакцин. Кроме того, трансформация пластид происходит с низкой частотой и возникают проблемы при отборе гомопластичных и гомопластидных растений [106, 107]. В связи с этими недостатками, несмотря на всю привлекательность транспластичных растений, синтезировать VLP-вакцины в хлоропластах удавалось только в нескольких единичных случаях.

Ген белка L1 HPV-16 методом биобаллистической трансформации был встроен в хлоропластный геном *N. tabacum*, а последующий многоступенчатый отбор привел к получению гомопластичных и гомопластидных растений, стабильно синтезирующих рекомбинантный белок L1 в хлоропластах. По сравнению с количеством L1, получаемым при ядерной трансформации табака (<0.1 мг/г сырой биомассы), содержание этого белка, синтезированного в хлоропластах, достигало 3 мг/г, что составляло 24% от ОРБ. По результатам седиментационного анализа ~30% L1 находилось в составе VLP, не отличающихся по форме и размеру от нативного вириона (диаметр ~60 нм). Остальные наночастицы были меньше 55 нм и состояли из 12–24 пентамерных капсомеров L1, тогда как полный капсид образован 72 капсомерами, то есть 360 молекулами L1. Иммунизация мышей частично очищенными экстрактами листьев транспластичных растений с добавлением адъюванта Фрейнда или гидроксида алюминия индуцировала продукцию HPV-нейтрализующих антител в сыворотке крови мышей в титрах 1 : 400 и 1 : 100 соответственно. Эти титры сопоставимы с таковыми для VLP HPV, синтезированными в клетках насекомых (1 : 400) [108]. В другом исследовании трансформацию хлоропластов *N. tabacum* геном белка L1 HPV проводили в двух вариантах: нативном и оптимизированном по составу кодонов. В результате полученный белок L1 составлял 1.5% от массы ОРБ. Наряду с VLP из L1-белка регистрировали более легкие фракции наночастиц, а также отдельные пентамерные капсомеры [109]. В транспластичных растениях *N. tabacum*, синтезирующих мутантный вариант рекомбинантного L1 HPV, у которого два консервативных остатка Cys, образующих дисульфидные связи, были заменены на остатки Ser, почти весь

белок L1 находился в составе капсомеров, также обладающих высокой иммуногенностью [110].

Белок Gag (Pr55^{gag}) ВИЧ-1 формирует VLP, обладающие высокой иммуногенностью, но при транзientной и ядерной экспрессии синтезируется в очень малом количестве. Продукция Pr55^{gag} ВИЧ-1 резко повышалась при экспрессии в хлоропластах транспластичных растений и достигала 7–8% от ОРБ. При слиянии гена белка Gag с последовательностью, кодирующей N-концевой участок фотосинтетического белка RbcL, было достигнуто 25-кратное увеличение уровня Gag (до 338 мг/кг сырой биомассы) в транспластичных растениях *N. tabacum*. Также обнаружили, что накопление Gag падает в старых листьях табака, что может быть связано со сниженной интенсивностью транскрипции/трансляции в них и усилением протеолитической деградации белков. Электронная микроскопия подтвердила образование в хлоропластах VLP, не отличимых по форме и размеру от VLP ВИЧ-1, полученных в клетках насекомых [111]. В транспластичных растениях было синтезировано несколько экспериментальных VLP-вакцин: против DENV (из белков rgM/E) [112]) и против трех серотипов вируса полиомиелита [113] в хлоропластах салата и против вируса некроза нервов рыб (NNV) в генетически модифицированных хлоропластах *N. tabacum* [114].

Совершенно иной подход к повышению уровня накопления VLP-вакцин в растениях предложен в ряде других работ. Он заключается в транзientной или ядерной экспрессии вирусного гена, кодирующего VLP-образующий белок, слитый с транзитным сигнальным пептидом, направляющим синтезированный белок в хлоропласты. Низкая протеазная активность в хлоропластах позволяет значительно повысить выход вирусных белков и образованных ими VLP. Подробно этот подход рассмотрен в обзоре Т. Muthamilselvan и др. [115]. С использованием этого подхода в *N. benthamiana* и *N. tabacum* был синтезирован рекомбинантный белок L1 HPV-16, собирающийся в VLP и составляющий 11% от ОРБ [116]. В работе Т. Muthamilselvan с соавт. [117] получена ДНК-конструкция, кодирующая белок L1 HPV-16, слитый с 79-аминокислотной последовательностью белка хлоропластов RbcS, которая направляет белок в хлоропласты, а также с доменом SUMO. Одновременная транзientная экспрессия этого рекомбинантного белка с направляемой в хлоропласты специфической протеазой bdSENp1, расщепляющей белок по сайту SUMO, позволила синтезировать в *N. benthamiana* L1 HPV-16 с выходом 6–8 мкг на 1 г сырой биомассы и получить соответствующие VLP, обладавшие высокой иммуногенностью в экспериментах на мышах [117]. Введение в рекомбинантный белок Gag ВИЧ-1 последовательности другого транзитного пептида, направляющего белок в хлоропласты,

также приводило к увеличению продукции целевого белка в транзientной системе экспрессии *N. benthamiana* [111]. Цирковир свиней (porcine circovirus, PCV) вызывает серьезные заболевания свиней, с высоким уровнем летальности. При транзientной экспрессии в *N. benthamiana* рекомбинантного белка капсида (rCap) PCV типа 2, слитого с транзитным пептидом, направляющим белок в хлоропласты, были получены VLP PCV2 в количестве 102 мг/кг сырой биомассы, вызывающие сильный иммунный ответ у морских свинок [118].

Наряду с VLP для разработчиков эффективных вакцин представляют значительный интерес и другие наночастицы, которые могут быть синтезированы и накоплены в растениях. Прежде всего, это белковые тельца — производные эндоплазматического ретикула. Белковые тельца содержат мало воды, проявляют низкую протеазную активность, имеют высокую плотность седиментации и идеально подходят для длительного хранения и выделения больших количеств фармацевтических белков. Модифицированный N-концевой сигнальный пептид γ -зеина кукурузы, названный Zera, содержит 112 а.о.; он направляет слитый с ним белок в эндоплазматический ретикулум, где и образуются белковые тельца [119, 120]. Интересно, что сигнальный пептид Zera приводит к накоплению слитых с ним белков не только в клетках растений, но и в клетках насекомых и млекопитающих [120, 121]. При транзientной экспрессии гена белка E7 HPV-16, слитого с последовательностью, кодирующей пептид Zera, в *N. benthamiana* формировались белковые тельца E7 в количестве 0.1–6.0 г/кг сырой биомассы. У мышей, иммунизированных этими белковыми тельцами, регистрировали сильный как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ, а также регрессию экспериментальных опухолей. Слитый с E7 Zera-пептид усиливал иммуногенность E7-белковых телец по типу молекулярного адьюванта [122]. Недавно получены белковые тельца из рекомбинантного белка E_{np} ВИЧ-1, слитого с Zera-пептидом (gp140-Zera), которые у кроликов индуцировали сильный иммунный ответ [123].

Эластиноподобные сигнальные пептиды (ELP) [124, 125] и гидрофобины (HFB) [126] также относятся к перспективным молекулам для создания вакцин, основанных на формировании белковых телец. Как и Zera-пептид, они направляют слитый с ними рекомбинантный белок в эндоплазматический ретикулум с дальнейшим образованием белковых телец [127]. Использование этих пептидов для формирования белковых телец позволяет значительно повысить выход рекомбинантных белков. Так, экспрессия в листьях табака широко используемого в качестве репортера зеленого флуоресцентного белка (GFP), слитого с EPL, достигает 40% от ОРБ [128], а при слиянии с HFB — 51% [129].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, современная биотехнология открывает совершенно новые перспективы для создания безопасных и эффективных вакцин против широкого спектра возбудителей как вирусных, так и бактериальных инфекций. Кроме того, вакцины нового поколения эффективны при протозойных заболеваниях, в частности малярии, а также могут найти применение при неинфекционных патологиях, таких как болезнь Альцгеймера, аутоиммунные, системные и онкологические заболевания. VLP и другие биологические наночастицы, служащие основой этих новых вакцин, обеспечивают их высокую иммуногенность и презентацию иммунокомпетентным клеткам, а их биосинтез в клетках растений позволяет получать биобезопасные вакцинные продукты с относительно небольшими затратами и адекватными РТМ, а также их биобезопасность и невысокую себестоимость.

Производство VLP и других наночастиц представляет особый интерес для разработки вакцин нового поколения, так как они презентуют иммунокомпетентным клеткам млекопитающих множество эпитопов белкового антигена, причем без предварительного их синтеза в клетках, как это необходимо в случае ДНК- и мРНК-вакцин. Сравнимые с вирионами размеры VLP — еще один фактор, повышающий эффективность презентации антигенов иммунной системе. Этот эффект усиливается тем, что антигенные детерминанты многократно повторены на поверхности VLP. Довольно простые безоболочечные VLP могут быть синтезированы в разных экспрессионных системах, включая прокариотические. Однако прокариоты не способны ко многим РТМ, в том числе гликозилированию, что необходимо для высокой иммуногенности многих VLP вакцин. Для производства более сложных, eVLP-вакцин, используют эукариотические системы: дрожжевые, бакуловирусные, клетки насекомых и млекопитающих, — большинство из которых высокзатратны и трудно масштабируемы. Напротив, растения и культуры их клеток легко масштабируются и значительно дешевле. Кроме того, клетки растений способны к сложным РТМ — одному из ключевых факторов высокой иммуногенности VLP. Синтез вакцин в растениях также исключает их контаминацию вирусами животных и человека.

Сейчас в свете необходимости создания вакцин нового поколения на основе наночастиц сформировалось три главных направления: вакцины, основанные (i) на VLP патогенных вирусов человека и животных, (ii) на химерных VLP вирусов растений и (iii) на химерных вирусах растений, содержащих генетический материал самого вируса. Несколько особняком стоит еще одно направление — (iv) получение белковых телец, содержащих вирусные белки с антигенными детерминантами

соответствующего патогена. Первое, второе и четвертое направления безопасны для биосферы в целом, тогда как третье представляет определенную опасность для фитоценозов. Основное преимущество вакцин, основанных на VLP патогенных вирусов животных, состоит в том, что они презентуют иммунной системе все эпитопы антигена патогена, тогда как вакцины на основе химерных растительных вирусов и их VLP представляют только те эпитопы патогена, которые были слиты с белками, формирующими VLP. Кроме того, эти эпитопы, из-за особенностей конформации VLP-формирующих белков, могут оказаться недоступными для компетентных иммунных клеток. Но, с другой стороны, сами белки вирусов растений могут быть молекулярными адъювантами и усиливать иммуногенность вакцины.

Основной недостаток растительных экспрессионных систем — низкий выход продукта. Разработанные системы транзientной экспрессии позволяют получать в короткие сроки большие количества VLP и других наночастиц, предназначенных для создания вакцин нового поколения. Конститутивная экспрессия VLP-вакцин в хлоропластах транспластомных растений или ядерная трансформация с направлением синтезированных в цитоплазме белков в хлоропласты с помощью слитых с ними транзитных пептидов позволяет также получать большие количества VLP-вакцин в течение длительного времени. Направление синтезированных белков, слитых с сигнальными пептидами Zera, ELP или HFB, в эндоплазматический ретикулум и далее в белковые тельца позволяет постоянно синтезировать VLP-вакцины в большом количестве, а высокая плотность белковых телец облегчает их выделение и очистку. Таким образом, растительные системы экспрессии обладают многими преимуществами по сравнению с другими и представляют значительный интерес для получения вакцин нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (грант № FWNR-2022-0022).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. С.М. Розов и Е.В. Дейнеко внесли равный вклад в написание обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan X., Zhou M., Yu S., Jin Z., Zhao K. (2020) An overview of biodegradable nanomaterials and applications in vaccines. *Vaccine*. **38**, 1096–1104. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.031
2. Aida V., Pliasis V.C., Neasham P.J., North J.F., McWhorter K.L., Glover S.R., Kyriakis C.S. (2021) Novel vaccine

technologies in veterinary medicine: a herald to human medicine vaccines. *Front. Vet. Sci.* **8**, 654289. doi: 10.3389/fvets.2021.654289

3. Lampinen V., Heinimäki S., Laitinen O.H., Pesu M., Hankaniemi M.M., Blazevic V., Hytönen V.P. (2021) Modular vaccine platform based on the norovirus-like particle. *J. Nanobiotechnol.* **19**, 25. doi: 10.1186/s12951-021-00772-0
4. Noad R., Roy P. (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* **11**, 438–444. doi: 10.1016/s0966-842x(03)00208-7
5. Brisse M., Vrba S.M., Kirk N., Liang Y., Ly H. (2020) Emerging concepts and technologies in vaccine development. *Front. Immunol.* **11**, 2578. doi: 10.3389/fimmu.2020.583077
6. Hyman P., Trubl G., Abedon S.T. (2021) Virus-like particle: evolving meanings in different disciplines. *Phage (New Rochelle)*. **2**(1), 11–15. doi: 10.1089/phage.2020.0026
7. Bancroft J.B., Wagner G.W., Bracker C.E. (1968) The self-assembly of a nucleic-acid free pseudo-top component for a small spherical virus. *Virology*. **36**, 146–149. doi: 10.1016/0042-6822(68)90126-8
8. Erickson J.W., Bancroft J.B., Horne R.W. (1976) The assembly of papaya mosaic virus protein. *Virology*. **72**, 514–517. doi: 10.1016/0042-6822(76)90180-X
9. Mohsen M.O., Zha L., Cabral-Miranda G., Bachmann M.F. (2017) Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* **34**, 123–132. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.014
10. Zhang L., Xu W., Ma X., Sun X., Fan J., Wang Y. (2023) Virus-like particles as antiviral vaccine: mechanism, design, and application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **28**(1), 1–16. doi: 10.1007/s12257-022-0107-8
11. Сёмин Б.В., Ильин Ю.В. (2019) Вирусоподобные частицы как инструмент для производства вакцин. Молекуляр. биология. **53**(3), 367–379.
12. Huang Z., Chen Q., Hjelm B., Arntzen C., Mason H.A. (2009) DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 706–714. doi: 10.1002/bit.22299
13. He J., Lai H., Brock C., Chen Q. (2012) A novel system for rapid and cost-effective production of detection and diagnostic reagents of West Nile virus in plants. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 106783. doi: 10.1155/2012/106783
14. Santi L., Batchelor L., Huang Z., Hjelm B., Kilbourne J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H.S. (2008) An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine*. **26**, 1846–1854. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.053
15. Chroboczek J., Szurgot I., Szolajska E. (2014) Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim. Pol.* **61**(3), 531–539. doi: 10.18388/abp.2014_1875
16. Naskalska A., Pyrc K. (2015) Virus like particles as immunogens and universal nanocarriers. *Pol. J. Microbiol.* **64**, 3–13.
17. Keikha R., Daliri K., Jebali A. (2021) The use of nanobiotechnology in immunology and vaccination. *Vaccines (Basel)*. **9**, 74. doi: 10.3390/vaccines9020074

18. Bundy B.C., Swartz J.R. (2011) Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *J. Biotechnol.* **154**, 230–239. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.04.011
19. Bundy B.C., Franciszkowicz M.J., Swartz J.R. (2008) *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 28–37. doi: 10.1002/bit.21716
20. Lua L.H., Connors N.K., Sainsbury F., Chuan Y.P., Wibowo N., Middelberg A.P. (2014) Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 425–440. doi: 10.1002/bit.25159
21. Li H.-Y., Han J.-F., Qin C.-F., Chen R. (2013) Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potentially elicits protective immune responses in mice. *Vaccine*. **31**, 3281–3287. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.019
22. Fernandes F., Teixeira A.P., Carinhas N., Carrondo M.J., Alves P.M. (2013) Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. *Expert Rev. Vaccines*. **12**, 225–236. doi: 10.1586/erv.12.153
23. Scotti N., Rybicki E.P. (2013) Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. **12**, 211–224. doi: 10.1586/erv.12.147
24. French T., Roy P. (1990) Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J. Virol.* **64**, 1530–1536. doi: 10.1128/jvi.64.4.1530-1536.1990
25. Lin Y.-L., Yu C.-I., Hu Y.-C., Tsai T.-J., Kuo Y.-C., Chi W.-K., Lin A.N., Chiang B.L. (2012) Enterovirus type 71 neutralizing antibodies in the serum of macaque monkeys immunized with EV71 virus-like particles. *Vaccine*. **30**, 1305–1312. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.081
26. Brautigam S., Snezhkov E., Bishop D.H. (1993) Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3, and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polypeptide. *Virology*. **192**, 512–524. doi: 10.1006/viro.1993.1067
27. Vieira H.L., Esteve C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F., Cruz P.E., Carrondo M.J., Alves P.M. (2005) Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* **120**, 72–82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.03.026
28. Kirnbauer R., Taub J., Greenstone H., Roden R., Durst M., Gissmann L., Lowy D.R., Schiller J.T. (1993) Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1–L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **67**, 6929–6936. doi: 10.1128/jvi.67.12.6929-6936.1993
29. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., Ahmadian G. (2021) Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnol.* **19**, 59. doi: 10.1186/s12951-021-00806-7
30. Baumert T.F., Ito S., Wong D.T., Liang T.J. (1998) Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells. *J. Virol.* **72**, 3827–3836. doi: 10.1128/JVI.72.5.3827-3836.1998
31. Kushnir N., Streatfield S.J., Yusibov V. (2012) Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*. **31**, 58–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083
32. Welsch S., Muller B., Krausslich H.-G. (2007) More than one door – budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett.* **581**, 2089–2097. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.060
33. Zhang P., Narayanan E., Liu Q., Tsybovsky Y., Boswell K., Ding S., Hu Z., Follmann D., Lin Y., Miao H., Schmeisser H., Rogers D., Falcone S., Elbashir S.M., Presnyak V., Bahl K., Prabhakaran M., Chen X., Sarfo E.K., Ambrozak D.R., Gautam R., Martin M.A., Swerczek J., Herbert R., Weiss D., Misamore J., Ciaramella G., Himansu S., Stewart-Jones G., McDermott A., Koup R.A., Mascola J.R., Finzi A., Carfi A., Fauci A.S., Lusso P. (2021) A multiclade *env-gag* VLP mRNA vaccine elicits tier-2 HIV-1-neutralizing antibodies and reduces the risk of heterologous SHIV infection in macaques. *Nat. Med.* **27**, 2234–2245. doi: 10.1038/s41591-021-01574-5
34. Mortola E., Roy P. (2004) Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett.* **576**, 174–178. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.009
35. Rudd P.M., Wormald M.R., Stanfield R.L., Huang M., Mattsson N., Speir J.A., DiGennaro J.A., Fetrow J.S., Dwek R.A., Wilson I.A. (1999) Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol.* **293**, 351–366. doi: 10.1006/jmbi.1999.3104
36. Fontes-Garfias C.R., Shan C., Luo H., Muruato A.E., Medeiros D.B., Mays E., Xie X., Zou J., Roundy C.M., Wakamiya M., Rossi S.L., Wang T., Weaver S.C., Shi P.Y. (2017) Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. *Cell Rep.* **21**, 1180–1190. doi: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.016
37. Bryant J.E., Calvert A.E., Mesesan K., Crabtree M.B., Volpe K.E., Silengo S., Kinney R.M., Huang C.Y., Miller B.R., Roehrig J.T. (2007) Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth *in vitro* but not for growth in intrathoracic inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology*. **366**, 415–423. doi: 10.1016/j.virol.2007.05.007
38. Marsian J., Fox H., Bahar M.W., Kotecha A., Fry E.E., Stuart D.I., Macadam A.J., Rowlands D.J., Lomonosoff G.P. (2017) Plant-made polio type 3 stabilized VLPs – a candidate synthetic polio vaccine. *Nat. Commun.* **8**, 245. doi: 10.1038/s41467-017-00090-w
39. Chen B.J., Leser G.P., Morita E., Lamb R.A. (2007) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J. Virol.* **81**, 7111–7123. doi: 10.1128/JVI.00361-07
40. Yamshchikov G.V., Ritter G.D., Vey M., Compans R.W. (1995) Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system. *Virology*. **214**, 50–58. doi: 10.1006/viro.1995.9955
41. McGinnes L.W., Pantua H., Laliberte J.P., Gravel K.A., Jain S., Morrison T.G. (2010) Assembly and biological and

- immunological properties of Newcastle disease virus-like particles. *J. Virol.* **84**, 4513–4523.
doi: 10.1128/JVI.01931-09
42. Wetzel D., Barbican A., Jenzelewski V., Schembecker G., Merz J., Piontek M. (2019) Bioprocess optimization for purification of chimeric VLP displaying BVDV E2 antigens produced in yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biotechnol.* **306**, 203–212.
doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.10.008
 43. Latham T., Galarza J.M. (2001) Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* **75**, 6154–6165.
doi: 10.1128/JVI.75.13.6154–6165
 44. Caldeira J.C., Perrine M., Pericle F., Cavallo F. (2020) Virus-like particles as an immunogenic platform for cancer vaccines. *Viruses*. **12**, 488.
doi: 10.3390/v12050488
 45. Tremouillaux-Guiller J., Moustafa K., Hefferon K., Gaobotse G., Makhzoum, A. (2020) Plant-made HIV vaccines and potential candidates. *Curr. Opin. Biotechnol.* **61**, 209–216.
doi: 10.1016/j.copbio.2020.01.004
 46. Andersson A.C., Schwerdtfeger M., Holst P.J. (2018) Virus-like-vaccines against HIV. *Vaccines* (Basel). **6**, 10.
doi: 10.3390/vaccines6010010
 47. Qian C., Liu X., Xu Q., Wang Z., Chen J., Li T., Zheng Q., Yu H., Gu Y., Li S., Xia N. (2020) Recent progress on the versatility of virus-like particles. *Vaccines* (Basel). **8**, 139.
doi: 10.3390/vaccines8010139
 48. Huang X., Wang X., Zhang J., Xia N., Zhao Q. (2017) *Escherichia coli*-derived virus-like particles in vaccine development. *NPJ Vaccines*. **2**, 3.
doi:10.1038/s41541-017-0006-8
 49. Balke I., Zeltins A. (2020) Recent advances in the use of plant virus-like particles as vaccines. *Viruses*. **12**, 270.
doi: 10.3390/v12030270
 50. Chichester J.A., Green B.J., Jones R.M., Shoji Y., Miura K., Long C.A., Yusibov V. (2018) Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: a phase I dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine*. **36**, 5865–5871.
doi: 10.1016/j.vaccine.2018.08.33
 51. Chackerian B. (2010) Virus-like particle based vaccines for Alzheimer disease. *Hum. Vaccin.* **6**, 926–930.
doi: 10.4161/hv.6.11.12655
 52. Mohsen M.O., Bachmann M.F. (2022) Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cell. Mol. Immunol.* **19**, 993–1011.
doi: 10.1038/s41423-022-00897-8
 53. Namdeo N., Arora R., Jha H. (2023) Biomedical application of advanced microbial approaches: nutraceuticals, biomedicine, and vaccine development. In: *Industrial Microbiology and Biotechnology: Emerging Concepts in Microbial Technology*. Ed. Verma P. Singapore: Springer, pp. 273–297.
doi: 10.1007/978-981-99-2816-3_9
 54. Ren J., Bell G., Coy D., Brunicardi F. (1997) Activation of human somatostatin receptor type 2 causes inhibition of cell growth in transfected HEK293 but not in transfected CHO cells *J. Surg. Res.* **71**, 13–18.
doi: 10.1006/jsre.1997.5097
 55. Donaldson B., Al-Barwani F., Young V., Scullion S., Ward V., Young S. (2015) Virus-like particles, a versatile subunit vaccine platform. In: *Subunit Vaccine Delivery. Advances in Delivery Science and Technology*. Eds Foged C., Rades T., Perrie Y., Hook S. New York: Springer. pp. 159–180.
doi: 10.1007/978-1-4939-1417-3_9
 56. Chang. G.-D., Chen C.-J., Lin C.-Y., Chen H.-C., Chen H. (2003) Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. *J. Biotechnol.* **102**, 61–71.
doi: 10.1016/S0168-1656(02)00364-4
 57. Glass P.J., White L.J., Ball J.M., Leparco-Goffart I., Hardy M.E., Estes M.K. (2000) Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* **74**, 6581–6591.
doi: 10.1128/JVI.74.14.6581–6591.2000
 58. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. (2005) Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*. **23**, 2042–2048.
doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.006
 59. Sainsbury F., Lomonosoff G.P. (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol.* **148**, 1212–1218.
doi: 10.1104/pp.108.126284
 60. Nikitin N., Vasiliev Y., Kovalenko A., Ryabchevskaya E., Kondakova O., Evtushenko E., Karpova O. (2023) Plant viruses as adjuvants for next-generation vaccines and immunotherapy. *Vaccines* (Basel). **11**, 1372.
doi: 10.3390/vaccines11081372
 61. Zhang T., Breitbart M., Lee W.H., Run J.-Q., Wei C.L., Soh S.W.L., Hibberd M.L., Liu E.T., Rohwer F., Ruan Y. (2005) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* **4**, e3.
doi: 10.1371/journal.pbio.0040003
 62. Venkataraman S., Hefferon K. (2021) Application of plant viruses in biotechnology, medicine, and human health. *Viruses*. **13**, 1697.
doi: 10.3390/v13091697
 63. Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D.C., Koprowski H. (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 5784–5788.
doi: 10.1073/pnas.94.11.5784
 64. Jones R.M., Chichester J.A., Mett V., Jaje J., Tottey S., Manceva S., Casta L.J., Gibbs S.K., Musiyuchuk K., Shamoul M., Norikane J., Mett V., Streatfield S.J., van de Vegte-Bolmer M., Roeffen W., Sauerwein R.W., Yusibov V. (2013) A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against *Plasmodium falciparum* in immunized mice. *PLoS One*. **8**, e79538.
doi: 10.1371/journal.pone.0079538
 65. Yusibov V., Mett V., Mett V., Davidson C., Musiyuchuk K., Gilliam S., Farese A., Macvittie T., Mann D. (2005) Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine*. **23**, 2261–2265.
doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.039
 66. Zinkhan S., Ogrina A., Balke I., Resevica G., Zeltins A., de Brot S., Lipp C., Chang X., Zha L., Vogel M. (2021) The impact of size on particle drainage dynamics and antibody response. *J. Control Release*. **331**, 296–308.
doi: 10.1016/j.conrel.2021.01.012
 67. Pomwised R., Intamaso U., Teintze M., Young M., Pincus S.H. (2016) Coupling peptide antigens to virus-like

- particles or to protein carriers influences the Th1/Th2 polarity of the resulting immune response. *Vaccines* (Basel). **4**, 15. doi: 10.3390/vaccines4020015
68. Santoni M., Zampieri R., Avesani L. (2020) Plant virus nanoparticles for vaccine applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* **21**, 344–356. doi: 10.2174/1389203721666200212100255
 69. Kalnciema I., Skrastina D., Ose V., Pumpens P., Zeltins A. (2012) Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol. Biotechnol.* **52**, 129–139. doi: 10.1007/s12033-011-9480-9
 70. Ogrina A., Skrastina D., Balke I., Kalnciema I., Jansons J., Bachmann M.F., Zeltins A. (2022) Comparison of bacterial expression systems based on potato virus Y-like particles for vaccine generation. *Vaccines* (Basel). **10**, 485. doi: 10.3390/vaccines10040485
 71. Leclerc D., Rivest M., Babin C., López-Macias C., Savard P. (2013) A novel M2e based flu vaccine formulation for dogs. *PloS One*. **8**, e77084. doi: 10.1371/journal.pone.0077084
 72. Hu H., Steinmetz N.F. (2021) Development of a virus-like particle-based anti-HER2 breast cancer vaccine. *Cancers*. **13**, 2909. doi: 10.3390/cancers13122909
 73. Denis J., Majeau N., Acosta-Ramirez E., Savard C., Bedard M.C., Simard S., Leclerc D. (2007) Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology*. **363**, 59–68. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.011
 74. Mathieu C., Rioux G., Dumas M.C., Leclerc D. (2013) Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Nanomedicine*. **9**, 839–848. doi: 10.1016/j.nano.2013.02.009
 75. Lebel M.È., Daudelin J.F., Chartrand K., Tarrab E., Kalinke U., Savard P., Lamarre A. (2014) Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8⁺ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **192**, 1071–1078. doi: 10.4049/jimmunol.1302030
 76. Palmer K.E., Benko A., Doucette S.A., Cameron T.I., Foster T., Hanley K.M., Christensen N.D. (2006) Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes. *Vaccine*. **24**, 5516–5525. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.058
 77. Zeltins A., West J., Zabel F., El Turabi A., Balke I., Haas S., Bachmann M.F. (2017) Incorporation of tetanus-epitope into virus-like particles achieves vaccine responses even in older recipients in models of psoriasis, Alzheimer's and cat allergy. *NPJ Vaccines*. **2**, 30. doi: 10.1038/s41541-017-0030-8
 78. Manuel-Cabrera C.A., Vallejo-Cardona A.A., Padilla-Camberos E., Hernández-Gutiérrez R., Herrera-Rodríguez S.E., Gutiérrez-Ortega A. (2016) Self-assembly of hexahistidine-tagged tobacco etch virus capsid protein into microfilaments that induce IgG2-specific response against a soluble porcine reproductive and respiratory syndrome virus chimeric protein. *Viol. J.* **13**(1), 196. doi: 10.1186/s12985-016-0651-y
 79. D'Aoust M.A., Couture M.M.J., Charland N., Trepanier S., Landry N., Ors F., Vézina L.P. (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 607–619. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x
 80. Pillet S., Racine T., Nfon C., Di Lenardo T.Z., Babiuk S., Ward B.J., Kobinger G.P., Landry N. (2015) Plant-derived H7 VLP vaccine elicits protective immune response against H7N9 influenza virus in mice and ferrets. *Vaccine*. **33**, 6282–6289. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.065
 81. Dennis S.J., Meyers A.E., Guthrie A.J., Hitzeroth I.I., Rybicki E.P. (2018) Immunogenicity of plant-produced African horse sickness virus-like particles: implications for a novel vaccine. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 442–450. doi: 10.1111/pbi.12783
 82. Eidenberger L., Kogelmann B., Steinkellner H. (2023) Plant-based biopharmaceutical engineering. *Nat. Rev. Biotech.* **1**, 426–439. doi: 10.1038/s44222-023-00044-6
 83. Joung Y.H., Park S.H., Moon K.-B., Jeon J.-H., Cho H.-S., Kim H.-S. (2016) The last ten years of advancements in plant-derived recombinant vaccines against hepatitis B. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1715. doi: 10.3390/ijms17101715
 84. Pirahmadi S., Afzali S., Zargar M., Zakeri S., Mehrizi A.A. (2021) How can we develop an effective subunit vaccine to achieve successful malaria eradication? *Microb. Pathog.* **160**, 105203. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105203
 85. Stander J., Mbewana S., Meyers A.E. (2022) Plant-derived human vaccines: recent developments. *BioDrugs*. **36**, 573–589. doi: 10.1007/s40259-022-00544-8
 86. Ward B.J.; Séguin A., Couillard J., Trépanier S., Landry N. (2021) Phase III: randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age. *Lancet*. **396**, 1491–1503. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32014-6
 87. Ward B.J., Gobeil P., Séguin A., Atkins J., Boulay I., Charbonneau P.Y., Couture M., D'Aoust M.A., Dhaliwall J., Finkle C., Hager K., Mahmood A., Makarkov A., Cheng M.P., Pillet S., Schimke P., St-Martin S., Trépanier S., Landry N. (2021) Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nat. Med.* **27**, 1071–1078. doi: 10.3390/life13030617
 88. Hager K.J., Perez Marc G., Gobeil P., Diaz R.S., Heizer G., Llapur C., Makarkov A.I., Vasconcellos E., Pillet S., Riera F., Saxena P., Geller Wolff P., Bhutada K., Wallace G., Aazami H., Jones C.E., Polack F.P., Ferrara L., Atkins J., Boulay I., Dhaliwall J., Charland N., Couture M.M.J., Jiang-Wright J., Landry N., Lapointe S., Lorin A., Mahmood A., Moulton L.H., Pahmer E., Parent J., Séguin A., Tran L., Breuer T., Ceregido M.A., Koutsoukos M., Roman F., Namba J., D'Aoust M.A., Trepanier S., Kimura Y., Ward B.J.; CoVLP Study Team. (2022) Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **386**, 2084–2096. doi: 10.1056/NEJMoa2201300
 89. Royal J.M., Simpson C.A., McCormick A.A., Phillips A., Hume S., Morton J., Shepherd J., Oh Y., Swope K., De Beauchamp J.L., Webby R.J., Cross R.W., Borisevich V.,

- Geisbert T.W., Demarco J.K., Bratcher B., Haydon H., Pogue G.P. (2021) Development of a SARS-CoV-2 vaccine candidate using plant-based manufacturing and a tobacco mosaic virus-like nano-particle. *Vaccines* (Basel). **9**, 1347. doi: 10.3390/vaccines9111347
90. Demarco J.K., Royal J.M., Severson W.E., Gabbard J.D., Hume S., Morton J., Swope K., Simpson C.A., Shepherd J.W., Bratcher B., Palmer K.E., Pogue G.P. (2021) CoV-RBD121-NP vaccine candidate protects against symptomatic disease following SARS-CoV-2 challenge in K18-hACE2 mice and induces protective responses that prevent COVID-19-associated immunopathology. *Vaccines* (Basel). **9**, 1346. doi: 10.3390/vaccines9111346
 91. Kumar A.U., Kadiresen K., Gan W.C., Ling A.P.K. (2021) Current updates and research on plant-based vaccines for coronavirus disease 2019. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **10**, 13. doi: 10.7774/cevr.2021.10.1.13
 92. Yang M., Lai H., Sun H., Che Q. (2017) Virus-like particles that display Zika virus envelope protein domain III induce potent neutralizing immune responses in mice. *Sci. Rep.* **7**, 7679. doi: 10.1038/s41598-017-08247-9
 93. Langerak T., Mumtaz N., Koopmans M., Schoenmakers S., Rockx B. (2022) Comparative analysis of *in vitro* models to study antibody-dependent enhancement of Zika virus infection. *Viruses*. **14**, 2776. doi: 10.3390/v14122776
 94. Cabral-Miranda G., Lim S.M., Mohsen M.O., Pobelov I.V., Roesti E.S., Heath M.D., Skinner M.A., Kramer M.F., Martina B.E.E., Bachmann M.F. (2019) Zika virus-derived E-DIII protein displayed on immunologically optimized VLPs induces neutralizing antibodies without causing enhancement of Dengue virus infection. *Vaccines* (Basel). **7**, 72. doi: 10.3390/vaccines7030072
 95. Pang E.L., Peyret H., Ramirez A., Loh H.S., Lai K.S., Fang C.M., Rosenberg W.M., Lomonosoff G.P. (2019) Epitope presentation of dengue viral envelope glycoprotein domain III on hepatitis B core protein virus-like particles produced in *Nicotiana benthamiana*. *Front. Plant Sci.* **10**, 455. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00455>
 96. Ponndorf D., Meshcheriakova Y., Thuenemann E.C., Dobon Alonso A., Overman R., Holton N., Dowall S., Kennedy E., Stocks M., Lomonosoff G.P., Peyret H. (2021) Plant-made dengue virus-like particles produced by co-expression of structural and non-structural proteins induce a humoral immune response in mice. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 745–756. doi: 10.1111/pbi.13501
 97. Asghar N., Melik W., Paulsen K.M., Pedersen B.N., Bø-Granquist E.G., Vikse R., Stuen S., Andersson S., Strid Å., Andreassen Å.K., Johansson M. (2022) Transient expression of *Flavivirus* structural proteins in *Nicotiana benthamiana*. *Vaccines* (Basel). **10**, 1667. doi: 10.3390/vaccines10101667
 98. Jääskeläinen A., Han X., Niedrig M., Vaheri A., Vapalahti O. (2003) Diagnosis of tick-borne encephalitis by a μ -capture immunoglobulin M-enzyme immunoassay based on secreted recombinant antigen produced in insect cells. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4336–4342. doi: 10.1128/JCM.41.9.4336-4342.2003
 99. Chen T.H., Hu C.C., Liao J.T., Lee Y.L., Huang Y.W., Lin N.S., Lin Y.L., Hsu Y.H. (2017) Production of Japanese encephalitis virus antigens in plants using bamboo mosaic virus-based vector. *Front. Microbiol.* **8**, 788. doi: 10.3389/fmicb.2017.00788
 100. Mackenzie J.S., Gubler D.J., Petersen L.R. (2004) Emerging *Flaviviruses*: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and Dengue viruses. *Nat. Med.* **10**, S98–S109. doi: <https://doi.org/10.1038/nm1144>
 101. He J., Lai H., Esqueda A., Chen Q. (2021) Plant-produced antigen displaying virus-like particles evokes potent antibody responses against West Nile virus in mice. *Vaccines* (Basel). **9**, 60. doi: 10.3390/vaccines9010060
 102. Chen Q. (2015) Plant-made vaccines against West Nile virus are potent, safe, and economically feasible. *Biotechnol. J.* **10**, 671–680. doi: 10.1002/biot.201400428
 103. Mohsen M.O., Speiser D.E., Knuth A., Bachmann M.F. (2020) Virus-like particles for vaccination against cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **12**, e1579. doi: 10.1002/wnan.1579
 104. Shanmugaraj B., Malla A., Bulaon C.J.I., Phoolcharoen W., Phoolcharoen N. (2022) Harnessing the potential of plant expression system towards the production of vaccines for the prevention of human papillomavirus and cervical cancer. *Vaccines* (Basel). **10**, 2064. doi: 10.3390/vaccines10122064
 105. Kessans S.A., Linhart M.D., Matoba N., Mor T. (2013) Biological and biochemical characterization of HIV-1 Gag/dgp41 virus-like particles expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 681–690. doi: 10.1111/pbi.12058
 106. Rozov S.M., Zagorskaya A.A., Konstantinov Y.M., Deineko E.V. (2023) Three parts of the plant genome: on the way to success in the production of recombinant proteins. *Plants* (Basel). **12**, 38. doi: 10.3390/plants12010038
 107. Dubey K.K., Luke G.A., Knox C., Kumar P., Pletschke B.I., Singh P.K., Shukla P. (2018) Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools. *Brief. Funct. Genomics.* **17**, 295–307. doi: 10.1093/bfpg/ely020
 108. Fernández-San Millán A., Ortigosa S.M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J.M., Gaétan J., Coursaget P., Veramendi J. (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.* **6**, 427–441. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00338.x
 109. Lenzi P., Scotti N., Alagna F., Tornesello M.L., Pompa A., Vitale A., Cardi T. (2008) Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic Res.* **17**, 1091–1102. doi: 10.1007/s11248-008-9186-3
 110. Waheed M.T., Thönes N., Müller M., Hassan S.W., Raza N.M., Lössl E., Lössl A.G. (2011) Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines. *Transgenic Res.* **20**, 271–282. doi: 10.1007/s11248-010-9415-4
 111. Scotti N., Alagna F., Ferraiolo E., Formisano G., Sannino L., Buonaguro L., De Stradis A., Vitale A., Monti L.,

- Grillo S., Buonaguro F.M., Cardi T. (2009) High-level expression of the HIV-1 Pr55^{gag} polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. *Planta*. **229**, 1109–1122. doi: 10.1007/s00425-009-0898-2
112. Kanagaraj A.P., Verma D., Daniell H. (2011) Expression of dengue-3 premembrane and envelope polyprotein in lettuce chloroplast. *Plant Mol. Biol.* **76**, 323–333. doi: 10.1007/s11103-011-9766-0
113. Daniell H., Rai V., Xiao Y. (2019) Cold chain and virus-free oral polio booster vaccine made in lettuce chloroplasts confers protection against all three poliovirus serotypes. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 1357–1368. doi: 10.1111/pbi.13060
114. Nakahira Y., Mizuno K., Yamashita H., Tsuchikura M., Takeuchi K., Shiina T., Kawakami H. (2021) Mass production of virus-like particles using chloroplast genetic engineering for highly immunogenic oral vaccine against fish disease. *Front. Plant Sci.* **12**, 717952. doi: 10.3389/fpls.2021.717952
115. Muthamilselvan T., Kim J.S., Cheong G., Hwang I. (2019) Production of recombinant proteins through sequestration in chloroplasts: a strategy based on nuclear transformation and post-translational protein import. *Plant Cell Rep.* **38**, 825–833. doi: 10.1007/s00299-019-02431-z
116. Maclean J., Koekemoer M., Olivier A.J., Stewart D., Hitzeroth I.I., Rademacher T., Fischer R., Williamson A.L., Rybicki E.P. (2007) Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J. Gen. Virol.* **88**, 1460–1469. doi: 10.1099/vir.0.82718-0
117. Muthamilselvan T., Khan M.R.I., Hwang I. (2023) Assembly of human papillomavirus 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* chloroplasts into highly immunogenic virus-like particles. *J. Plant Biol.* **66**, 331–340. doi: 10.1007/s12374-023-09393-6
118. Park Y., Min K., Kim N.H., Kim J.H., Park M., Kang H., Sohn E.J., Lee S. (2021) Porcine circovirus 2 capsid protein produced in *N. benthamiana* forms virus-like particles that elicit production of virus-neutralizing antibodies in guinea pigs. *N. Biotechnol.* **63**, 29–36. doi: 10.1016/j.nbt.2021.02.005
119. Kogan M.J., Dalcol I., Gorostiza P., Lopez-Iglesias C., Pons R., Pons M., Sanz F., Giralt E. (2002) Supramolecular properties of the proline-rich gamma-zein N-terminal domain. *Biophys. J.* **83**, 1194–1204. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75243-0
120. Torrent M., Llop-Tous I., Ludevid M.D. (2009) Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. In: *Recombinant Proteins from Plants: Methods and Protocols*. Eds Gomord V., Faye L. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 193–208. doi: 10.1007/978-1-59745-407-0_11
121. Torrent M., Llopart B., Lasserre-Ramassamy S., Llop-Tous I., Bastida M., Marzabal P., Westernholm-Parvinen A., Saloheimo M., Htietz P.B., Ludevid M.D. (2009) Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC Biol.* **7**, 5. doi: 10.1186/1741-7007-7-5
122. Whitehead M., Öhlschläger P., Almajhdi F.N., Alloza L., Marzábal P., Meyers A.E., Hitzeroth I.I., Rybicki E.P. (2014) Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein bodies cause tumour regression in mice. *BMC Cancer*. **14**, 367. doi: 10.1186/1471-2407-14-367
123. Ximba P.T. (2021) Investigation of particulate HIV-1 Env vaccine candidates using Zera® and SpyTag/SpyCatcher technologies. PhD Thesis, Faculty of Health Sciences, Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Cape Town, South Africa. <http://hdl.handle.net/11427/36730>
124. Conley A.J., Joensuu J.J., Jevnikar A.M., Menassa R., Brandle J.E. (2009) Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 562–573. doi: 10.1002/bit.22278
125. Han Y., Pan J., Ma Y., Zhou D., Xu W. (2022) Protein-based biomaterials for combating viral infections: current status and future prospects for development. *Biosafety Health*. **4**(2), 87–94. doi: 10.1016/j.bsheat.2022.03.005
126. Joensuu J.J., Conley A.J., Lienemann M., Brandle J.E., Linder M.B., Menassa R. (2010) Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **152**, 622–633. doi: 10.1104/pp.109.149021
127. Rozov S.M., Deineko E.V. (2022) Increasing the efficiency of the accumulation of recombinant proteins in plant cells: the role of transport signal peptides. *Plants* (Basel). **11**, 2561. doi: 10.3390/plants11192561
128. Saberianfar R., Joensuu J.J., Conley A.J., Menassa R. (2015) Protein body formation in leaves of *Nicotiana benthamiana*: a concentration-dependent mechanism influenced by the presence of fusion tags. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 927–937. doi: 10.1111/pbi.12329
129. Linder M.B., Qiao M., Laumen F., Selber K., Hyttiä T., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E. (2004) Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. *Biochemistry*. **43**, 11873–11882. doi: 10.1021/bi0488202

RECOMBINANT VLP VACCINES SYNTHESIZED IN PLANT EXPRESSION SYSTEMS: CURRENT UPDATES AND PROSPECTS

S. M. Rozov^{1, *}, E. V. Deineko^{1, **}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: rozov@bionet.nsc.ru*

***e-mail: deineko@bionet.nsc.ru*

The development and creation of a new generation vaccines based on recombinant proteins that assemble into virus-like particles (VLPs), as well as recombinant proteins in the form of nanoparticles are promising directions in modern biotechnology. Due to their large size (20–200 nm) and a multiplicity of viral antigenic determinants on the surface, VLPs can stimulate strong humoral and cellular immune responses. The review considered the main types of VLPs, as well as the features and disadvantages of the main expression systems used for their biosynthesis. The main focus was on plant expression systems that ensure the biosynthesis of a target recombinant protein from a DNA matrix integrated into the nuclear or chloroplast genomes of a plant (stable expression) or from a matrix for temporary production of the target product (transient expression). Various approaches for increasing the yield of VLP-forming recombinant proteins, including fusion with a transit peptide that directed the protein into the chloroplast, were discussed. The possibility of accumulation of recombinant proteins expressed in plants and intended for creation of VLP-vaccines in another type of nanoparticles, protein bodies, using specific signal sequences was also considered.

Keywords: recombinant proteins, virus-like particles, plant expression systems, stable expression, transient expression, VLP vaccine