

**СИСТЕМА ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛ В РАСТЕНИИ *NICOTIANA BENTHAMIANA*,
ОСНОВАННАЯ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВИРУСНОГО ВЕКТОРА, КОДИРУЮЩЕГО
ПРОЦЕССИРУЕМЫЙ *IN PLANTA* ПОЛИПРОТЕИН**

Е.В. Шешукова¹, Ф.А. Липскеров², Т.В. Комарова^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Введение

Растение представляет собой альтернативную животной клетке, универсальную платформу для накопления рекомбинантных белков, включая ферменты, вакцины и биосимиляры терапевтических антител. Существенным преимуществом растений перед другими системами экспрессии – это биобезопасность производства, т. е. возможность получать рекомбинантные белки, не имея на пути их производства стадий, вносящих потенциальные контаминанты животного происхождения. К таким контаминантам относятся патогенные для человека прионы, вирусы животных и человека или их нуклеиновые кислоты, которые с некой вероятностью могут содержаться в питательных средах для культур клеток млекопитающих [1]. Относительная неприхотливость растений позволяет так же снижать стоимость получения конечного продукта, как минимум за счёт того, что нет необходимости соблюдения стерильных условий, как выращивания, так и культивации. Таким образом, можно предположить, что растительная система способна обеспечить безопасную, эффективную, масштабируемую продукцию терапевтических моноклональных антител [2, 3]. Пригодность растительной клетки для продукции белков человека обуславливается схожестью с животной клеткой в механизмах экспрессии белков и их посттрансляционной модификации, включая гликозилирование [4]. К настоящему времени существуют разнообразные системы продукции, дающие возможность синтезировать рекомбинантные белки в растениях. Тем не менее, оптимизация имеющихся и разработка новых эффективных систем экспрессии, позволяющих получать в растениях моноклональные антитела, в том числе для диагностики и терапии онкологических заболеваний, представляется актуальной, т. к. потребность в рекомбинантных белках для фармацевтического и нефармацевтического потребления с каждым годом растет. Понимание принципов, лежащих в основе взаимодействия хозяина и патогена, создает основу для разработки новых подходов к использованию растений в качестве системы производства целевого белка. Ранее нами была создана биотехнологическая платформа продукции растительных биоаналогов трастузумаба¹ (РБТ) и пертузумаба (РБП), включающая синтез, выделение и очистку РБТ и РБП и их гликомодифицированных вариантов [4, 5]. Технология продукции антител в растениях *Nicotiana benthamiana* основывается на одновременной экспрессии в клетке генов тяжелой (ТЦ) и легкой цепи (ЛЦ) антител с двух векторов, доставляемых в клетку с помощью агробактерии [6]. Такая система подразумевает экспрессию генов с разных транскрипционных кассет, однако, при этом трудно контролировать относительный уровень экспрессии генов ЛЦ и ТЦ даже несмотря на то, что используемые регуляторные элементы (промотор и терминатор транскрипции) одни и те же. Во многих работах, описывающих продукцию антител как в клетках млекопитающих, так и в растениях, отмечается, что для корректного фолдинга, выхода и активности рекомбинантного антитела важную роль играет пропорция продуцируемых ЛЦ и ТЦ [7–9]. Оптимальным является эквимолярное соотношение, которого, однако, далеко не всегда удается достичь при использовании двух отдельных векторов. Одним из подходов, позволяющим получить эквимолярное количество ЛЦ и ТЦ, является синтез процессируемого в растительной клетке полипротеина, содержащего аминокислотные последовательности ЛЦ и ТЦ. Процессинг может осуществляться за счет присутствия между ЛЦ и ТЦ автокаталитического пептида 2А [10]. Другой вариант предполагает специфическое расщепление протеазами растительной клетки [11]. Показано, что в табаке есть Kex2 р-

¹ Здесь и далее растительный биоаналог (биосимиляр) трастузумаба (РБТ) – это антитело, продуцированное в растениях *N. benthamiana*, аминокислотные последовательности ЛЦ и ТЦ которого идентична аминокислотным последовательностям ЛЦ и ТЦ трастузумаба.

подобные протеазы, локализованные в *trans*-отделе аппарата Гольджи и обладающие субстратной специфичностью аналогичной Kex2 p протеазам дрожжей [12]. Kex2 p участвует в созревании белкового киллерного токсина КР6 из препротоксина патогена кукурузы *Ustilago maydis*. Это позволило выделить участок КР6pp (аминокислоты с 106 по 138, UniProtKB/Swiss-Prot no. P16948), расположенный между α и β субъединицами препротоксина КР6 [13].

В настоящей работе была создана система для суперпродукции полноразмерного растительного биоаналога трастузумаба (пРБТ) в виде единого процессируемого в клетке полипептида, в котором ТЦ и ЛЦ соединены мостиком (КР6pp) длиной 33 аминокислоты, узнаваемым kex2 p-подобной протеазой *N. benthamiana* [11, 13–16]. Также были разработаны способы повышения продуктивности новой системы с помощью одновременного введения в растительную клетку экспрессионного вектора, кодирующего целевой полипротеин, и дополнительных векторов, кодирующих белок с сигналом ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS), способных стимулировать репродукцию вируса [17].

Материалы и методы

Создание генноинженерных конструкций. Последовательность, кодирующая ЛЦ-КР6pp-ТЦ, была получена с помощью ПЦР с перекрывающимися фрагментами. Первый фрагмент представлял собой последовательность, кодирующую ЛЦ; второй фрагмент был получен путем "отжига" праймеров с последующей достройкой с помощью Taq-полимеразы в ходе ПЦР; третий фрагмент содержал последовательность, кодирующую ТЦ. В финальной ПЦР с использованием всех трех фрагментов и концевых праймеров был получен фрагмент, кодирующий ЛЦ с сигнальным пептидом, сайт узнавания kex2 p-протеазой и ТЦ без сигнального пептида. Этот фрагмент был клонирован в вектор pCambia1300 с предварительно добавленным дополнительным 35S-промотором и терминатором транскрипции. В результате была получена конструкция 35S-ЛЦ-КР6pp-ТЦ. Для получения вирусного вектора ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ для продукции пРБТ фрагмент, кодирующий ЛЦ-КР6pp-ТЦ, был перенесен в вектор TMV-НС [5].

Агроинфильтрация. Для получения растения *N. benthamiana*, продуцирующего пРБТ, доставку генетического материала в клетки листьев осуществляли с помощью *A. tumefaciens*, штамм GV3101. Ночную культуру бактерий ресуспендировали в буфере, содержащем 10 mM MES pH 5.5, 10 mM MgCl₂, до оптической плотности OD₆₀₀ ~ 0,1 и вводили в листья с помощью шприца без иглы. Далее растения в течение 3–5 дней инкубировали в теплице с соблюдением стандартных условий выращивания.

Выделение и очистка антител. Листья *N. benthamiana* гомогенизировали с добавлением 4–6 объемов фосфатного буфера (50 mM NaH₂PO₄/NaHPO₄, pH 7,0). Далее растительный экстракт фильтровали через Miracloth и осветляли центрифугированием при 16000xg в течение 10 минут. Затем проводили аффинную хроматографию при использовании сефарозы с белком G. Элюцию антител осуществляли 0,1 M раствором глицина, pH 3,0, с последующей нейтрализацией 0,4 M раствором Трис-НСI с pH 8,8. Для оценки выхода антител в растительных экстрактах или выделенных с помощью аффинной хроматографии использовали набор «IgG общий-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Культивация клеток и МТТ-тест. Для оценки функциональной активности антител использовали клеточную линию ВТ-474 (АТСС НТВ-20) с повышенной экспрессией онкогена HER2/neu. Культивация клеток проводилась как описано ранее [18]. Оценка эффективности ингибирования пролиферации клеток проводилась с использованием МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) – 2,5-дифенил-тетразолиум бромид] теста как описано ранее [4]. Оценку выживаемости клеток рассчитывали, принимая значения для отрицательного контроля за 100 %. Статистическую обработку результатов проводили, используя критерий Манна-Уитни.

Результаты

Для получения процессируемого РБТ (пРБТ) в листьях *N. benthamiana* мы создали экспрессионный вектор 35S-ЛЦ-КР6pp-ТЦ, кодирующий пРБТ в виде единого полипротеина, где аминокислотные последовательности ЛЦ и ТЦ слиты через линкер GGKRTIQDSATDTVDLGAELHRDDPPPTASDYGKRG (рисунок 1А). На рисунке 1Б показано, что в белковых экстрактах листьев *N. benthamiana* накапливаются полноразмерные антитела пРБТ

совпадающие по подвижности с положительным контролем, антителами, полученными при одновременном использовании индивидуальных векторов 35S-ЛЦ и 35S-ТЦ. В обоих случаях при агроинфильтрации листьев к каждой из бактериальных суспензий добавляли агробактерию, содержащую плазмиду, которая кодирует супрессор сайленсинга р19 вируса кустистой карликовости томатов [19]. Полученный результат указывает на то, что полипротеин эффективно процессируется в клетках листьев *N. benthamiana*, и происходит сборка антитела.

Для повышения уровня продукции мы создали вирусный вектор ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ (рисунок 1А) на основе модифицированного генома ВТМ, в который добавлены природные растительные интроны [5]. В отличие от непреплицирующихся векторов, использованных в первом эксперименте, вектор на основе вирусного генома способен обеспечивать более высокий выход целевого белка за счет того, что происходит репликация и синтез субгеномных РНК в клетке. Поэтому для дальнейших экспериментов и накопления препаративных количеств антител был использован ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ.

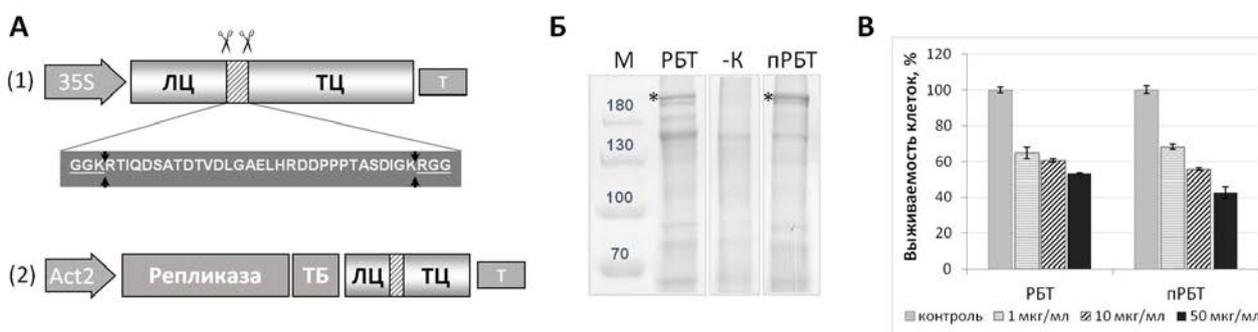


Рисунок 1. Продукция процессируемого РБТ (пРБТ) в растении *N. benthamiana*. (А) Схематическое изображение экспрессионных векторов, кодирующих слитый белок ЛЦ-КР6pp-ТЦ: (1) нереплицирующийся вектор 35S-ЛЦ-КР6pp-ТЦ и (2) реплицирующийся вектор ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ; 35S – промотор вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК), Т – терминатор транскрипции геномной РНК ВМЦК, Act2 – промотор гена act2 *Arabidopsis thaliana*, Репликаза – ген репликазы, ТБ – ген транспортного белка, заштрихованный прямоугольник – участок (КР6pp), узнаваемый эндогенной kex2 р-подобной протеазой растений. Приведена аминокислотная последовательность КР6pp-линкера, подчеркнуты аминокислоты, которые остаются на концах ЛЦ или ТЦ, соответственно, после процессинга, стрелками указаны сайты протеолиза. (Б) Суммарный растворимый белок листьев *N. benthamiana* через 3 дня после агроинфильтрации агробактерией, содержащей плазмиду 35S-ЛЦ-КР6pp-ТЦ (дорожка пРБТ) или при одновременном использовании индивидуальных векторов 35S-ЛЦ и 35S-ТЦ (дорожка РБТ). Разделение в 7,5 % ПААГ в невозстанавливающих условиях с последующей окраской Кумасси. – К – белки интактного листа; М – маркеры молекулярного веса. *, зона соответствующая полноразмерному антителу. (В) Ингибирование пролиферации клеток ВТ-474 (в процентах от контроля) при добавлении РБТ или пРБТ по результатам МТТ-теста. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Разница между контролем и клетками, инкубированными с антителами, статистически значима ($p < 0,001$, тест Манна-Уитни); разница между значениями для РБТ и пРБТ не является статистически значимой.

Дополнительным свидетельством корректности протеолитического процессинга полипептида пРБТ и сборки антитела является биологический тест, демонстрирующий способность пРБТ ингибировать пролиферацию HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы человека ВТ-474. МТТ тест (рисунок 1В) показал, что антипролиферативная активность РБТ и пРБТ по отношению к клеткам ВТ-474 практически не отличается. Таким образом, эндогенная kex2 р-подобная протеаза клеток *N. benthamiana* способна обеспечивать образование биологически активного РБТ из полипротеина ЛЦ-КР6pp-ТЦ.

Как правило для повышения эффективности продукции целевых белков в растениях используют супрессоры сайленсинга – белки фитовирусов, позволяющие подавить естественную противовирусную защитную реакцию растительной клетки [20]. Однако поиск альтернативных способов повышения продуктивности системы по-прежнему актуален. Недавно было показано, что активный синтез чужеродного белка, содержащего сигнал ядерной локализации (NLS), стимулирует репродукцию вируса за счет индукции экспрессии γ -тионина [17]. Однако применимость данного подхода была продемонстрирована только для модельного репортерного белка GFP. В продолжение этой работы мы проверили эффективность использования белков, содержащих NLS (ESATGKRAAEDDEDVDTKKQKTDEDD), для повышения продукции антител в растительной клетке с вирусного вектора. Для этого мы инфильтрировали растительную клетку вектором ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ совместно с конструкциями, кодирующими модельные NLS-содержащие белки (рисунок 2А). Уровень накопления пРБТ анализировали через 5 дней после инфильтрации. Все варианты mRFP/NLS стимулировали накопление пРБТ, о чем свидетельствуют результаты ИФА пРБТ выделенных из растительных экстрактов (рисунок 2Б). Все протестированные варианты NLS-содержащего белка оказывали сравнимый эффект на продуктивность вирусного вектора, повышая уровень накопления антител в 1.5 раза относительно контроля (серая линия на рисунке 2Б) – комбинации ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ и 35S-mRFP. Также стоит отметить, что супрессор сайленсинга HcPro А вируса картофеля [21], один из общепринятых инструментов повышения продуктивности системы транзientной экспрессии, используемый в «зеленой» биотехнологии, который в данной эксперименте играл роль положительного контроля, продемонстрировал такой же стимулирующий эффект на уровень накопления антитела. Полученный результат свидетельствует о том, что чужеродные NLS-содержащие белки могут применяться в качестве бустера для повышения выхода рекомбинантного белка в системе транзientной экспрессии с использованием векторов на основе ВТМ.

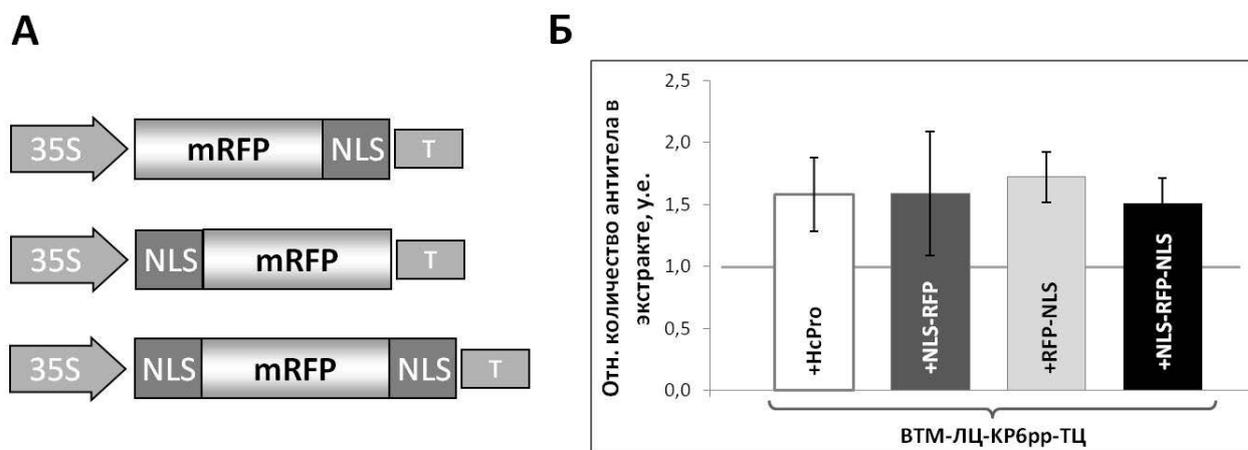


Рисунок 2. Синтез чужеродного NLS-содержащего белка в клетке стимулирует продукцию процессуемого полипротеина на матрице вирусного вектора ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ. (А) Схематическое изображение генноинженерных конструкций, кодирующих mRFP, слитый с NLS. (Б) уровень накопления антител в растительных экстрактах, полученных из зон листа, инфильтрированных ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ и одной из конструкций, представленных на панели (А). Значения нормированы на количество антител в контроле – экстракте из листьев, инфильтрированных ВТМ-ЛЦ-КР6pp-ТЦ и 35S-mRFP (серой линией обозначен уровень антител в контроле). В качестве положительного контроля использовали HcPro, белок-супрессор сайленсинга А вируса картофеля. Представлены средние значения и стандартная ошибка.

Заключение

Разработан новый инструмент для повышения продуктивности платформы для получения рекомбинантных антител в растении. Данный подход основан на: (1) транзientной системе экспрессии в растениях *N. benthamiana*; (2) использовании одного вектора на основе генома ВТМ вместо двух разных векторов; (3) синтезе цепей антитела в виде полипротеина с последующим процессингом и сборкой *in planta*; (4) стимуляции репродукции вирусного вектора с помощью NLS-содержащего белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-3828.2022.1.4

литература

- [1] K. Ko, R. Brodzik, Z. Stepkowski, in *Plant-produced Microbial Vaccines*, (Karasev, A.V.) Springer Berlin Heidelberg, 2009, **332**, 55.
- [2] A. Hiatt, K.J. Whaley, L. Zeitlin, *Microbiology Spectrum*, 2014, **2**, AID.
- [3] B.R. Holtz *et al.*, *Plant Biotechnology Journal*, 2015, **13**, 1180.
- [4] T.V. Komarova *et al.*, *Biochemistry (Moscow)*, 2017, **82**, 510.
- [5] T.V. Komarova *et al.*, *PloS One*, 2011, **6**, e17541.
- [6] T.V. Komarova, E.V. Sheshukova, Y.L. Dorokhov, *Current Medicinal Chemistry*, 2019, **26**, 381.
- [7] S. Schlatter *et al.*, *Biotechnology Progress*, 2005, **21**, 122.
- [8] R.D. Law *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 2006, **1760**, 1434.
- [9] S.C.L. Ho *et al.*, *Journal of Biotechnology*, 2013, **165**, 157.
- [10] L. Chen *et al.*, *Frontiers in Plant Science*, 2016, **7**, 1156.
- [11] K.T. Hamorsky *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, **57**, 2076.
- [12] H. Kinal *et al.*, *The Plant Cell*, 1995, **7**, 677.
- [13] L. Jiang, J.C. Rogers, *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 1999, **18**, 23.
- [14] P. Pillay *et al.*, *Bioengineered*, 2014, **5**, 15.
- [15] J. Tao *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 1990, **10**, 1373.
- [16] B. Zhang *et al.*, *Plant Biotechnology Journal*, 2011, **9**, 970.
- [17] E.V. Sheshukova *et al.*, *Plants*, 2022, **11**, 1530.
- [18] T.V. Komarova *et al.*, *Scientific Reports*, 2019, **9**.
- [19] Y.L. Dorokhov *et al.*, *FEBS letters*, 2006, **580**, 3872.
- [20] H.B. Scholthof, *Plant Physiology*, 2007, **145**, 1110.
- [21] L.K. Johansen, J.C. Carrington, *Plant Physiology*, 2001, **126**, 930.