

## **PICHA PASTORIS ЯК ВИСОКОПРОДУКТИВНИЙ ПРОДУЦЕНТ ДЛЯ РОЗРОБКИ ВАКЦИНИ ПРОТИ ВІРУСУ ПАПІЛОМИ ЛЮДИНИ**

**В.А. Гаврютіна<sup>1</sup>, Н.Ю. Масалітіна<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> магістр кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, НТУ «ХПІ», Харків, Україна

<sup>2</sup> доцент кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, канд. техн. наук, НТУ «ХПІ», Харків, Україна

[Vlada.Havriutina@ihti.khpi.edu.ua](mailto:Vlada.Havriutina@ihti.khpi.edu.ua)

Вірус папіломи людини (ВПЛ) – найбільш розповсюджений вірус, що передається статевим шляхом, онкогенні типи якого (16 і 18-й тип ВПЛ) у більшості випадків (близько 70 %) є фактором розвитку раку шийки матки [1]. Досить ефективним методом боротьби з даним захворюванням являється вакцинація. Розробка і пошук перспективних продуцентів для отримання профілактичних вакцин з високою біологічною дією – перспективний напрямок дослідження сучасної біотехнології.

Мета даної роботи – огляд, характеристика і порівняння потенційних продуцентів, що використовуються для синтезу рекомбінантного вірусного білку ВПЛ, а також розробка високопродуктивної експресійної системи на основі дріжджів виду *Pichia pastoris* шляхом застосування біотехнологічних і генно-інженерних підходів.

Для біосинтезу капсидного білку L1, що є основним компонентом вакцини проти ВПЛ використовуються різноманітні прокаріотичні і еукаріотичні системи. Окрім цього, розробляються удосконалені системи з трансгенних рослин або ослаблених бактерій, зокрема мутантні форми бактерій виду *Salmonella enterica* чи *Shigella* [1].

Найчастіше застосовуються наступні продуценти: дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* і бактерії виду *Echerichia coli*, кожен з яких має свої переваги і недоліки.

Бактерії *E. coli* – розповсюджений об'єкт для біотехнологічних виробництв, що характеризується простотою у генетичному маніпулюванні, дозволяючи отримувати цільовий продукт у надвисоких кількостях за досить короткий період ферментації під час зростання на дешевих поживних середовищах. Однак, *E. coli* як експресійна система має кілька недоліків: неможливість посттрансляційної модифікації цільового продукту; втрата плазмід; неправильне згортання білка та його агрегація у тільця включення, що ускладнює процес очистки, впливає на біологічну активність та підвищує вартість [2].

Інший широко розповсюджений продуцент – дріжджі виду *S. cerevisiae*, одноклітинні мікроорганізми, здатні до швидкого розмноження, які забезпечують внутрішньоклітинну модифікацію синтезованого білкового продукту, зокрема: ацилювання, фосфорилування, N- і O-зв'язане глікозилювання. Основні недоліки під час використання: дорого вартісна очистка; гіперглікозилювання цільового продукту (приєднання великої кількості залишків маннози), що призводить до скорочення часу напіврозпаду рекомбінантного білку *in vivo* і викликає імунну (алергічну) реакцію [2, 3].

Альтернативним варіантом є застосування під час виробництва ВПЛ-вакцини як перспективного продуценту експресійної дріжджової системи *P. pastoris*. Ці метилотрофні дріжджі використовують метанол як єдине джерело вуглецю і енергії та характеризуються кількома відмінними особливостями: можуть зростати на дешевих і простих за складом мінеральних середовищах; невибагливі до умов ферментації і здатні утворювати високу щільність клітин під час культивування; синтезують більш високу кількість секретованого білку порівняно з *S. cerevisiae*; накопичують токсичні метаболіти у мінімальних кількостях, а також модифікують чужорідні білки зі

зменшеною кількістю залишків манози (цільовий продукт не викликає імунної реакції у відповідь на введення вакцини до організму) [2, 3]. Всі вищеперераховані показники свідчать про безумовні переваги *P. pastoris* як ефективного продуценту для отримання вакцини проти вірусу папіломи людини біотехнологічним способом.

З метою підвищення виходу рекомбінантного білку, а також підвищення біологічної активності вірусного капсидного білку L1 ВПЛ пропонується удосконалити первинний мікроорганізм з використанням методів генної інженерії для отримання високопродуктивного рекомбінантного штаму *P. pastoris*. Для цього використовується технологія рекомбінантних ДНК, що дозволяє переносити генетичний матеріал з одного організму до іншого, де він експресується з утворенням цільового біопродукту.

Процес конструювання рекомбінантного штаму розпочинається з вибору нуклеотидної послідовності. Нуклеотидна послідовність необхідного гену ВПЛ 16L1, відповідального за синтез капсидного білку, розмір якої 1,5 тисячі нуклеотидів, повністю оптимізована шляхом підбору найбільш часто використовуваних кодонів у *P. pastoris*, внаслідок чого розроблена система буде проявляти більш високий рівень експресії цільового гену [4]. Ампліфікацію гену *HPV16L1* проводять з використанням двох праймерів: праймеру прямого синтезу, що містить сайт ендонуклеази рестрикції *BstBI*; праймеру зворотного синтезу з сайтом ендонуклеази рестрикції *KpnI* і фланкуючим стоп-кодоном. На початкових етапах конструювання застосовується бактеріальна плазміда *pUC18*. Обидва кінці цільового гену *HPV16L1*, що має визначену послідовність, вставляли в зазначену плазмиду, що містить два сайти рестрикції *EcoRI* і *KpnI*, з утворенням нової плазміди (*pUC-16L1*) [4]. Вищевказані праймери і плазміда *pUC-16L1* (матриця ДНК) застосовуються у полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР). Для переміщення фрагменту ДНК з одного вектора (бактеріального – *pUC-16L1*) до іншого (дріжджового – *pPICZA*), фрагмент ПЛР розщеплюють ендонуклеазами рестрикції *BstBI* і *KpnI* і лігують з фрагментами вектору експресії *pPICZA*. Створена рекомбінантна конструкція, що містить цільовий ген *HPV16L1* позначається як вектор *pPICZA-16L1*.

Збільшення ефективності інтеграції рекомбінантної плазміди *pPICZA-16L1* до дріжджової хромосоми *P. pastoris* забезпечується шляхом лінеаризації сконструйованої плазміди однотоковою рестриктазою *Sac I* [4]. Біотрансформація первинного штаму рекомбінантною плазмідною проводиться шляхом процесу електропорації. Отриманий генетично-модифікований штам висівається на поживні середовища з поступовим збільшенням концентрації антибіотику. Рекомбінантні колонії, стійкі до високої концентрації антибіотику пересівають на індукційне середовище для перевірки рівня експресії. Найбільш продуктивний рекомбінантний штам *P. pastoris* відділяють і використовують як посівну культуру під час виробництва вакцини проти ВПЛ.

Отже, було охарактеризовано можливі системи експресії, що використовуються для отримання вакцин проти ВПЛ на основі капсидного білку, порівняно їх переваги і недоліки, а також обґрунтовано вибір використання метилотрофних дріжджів *P. pastoris* як перспективного продуценту. Також розглянуто методику конструювання і отримання рекомбінантного штаму *P. pastoris* з більш високим рівнем експресії цільового продукту за рахунок використання генно-інженерних підходів.

#### Список літератури:

1. Yousefi Z. An update on human papilloma virus vaccines : history, types, protection, and efficacy / Z. Yousefi // Front. Immunol. : Sec. Vaccine and Mol. Therapeutic, 2022. – V.12. – P. 937–958.
2. Gomes A. M. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production / A. M. Gomes, T. S. Carmo, F. M. Bahia, N. S. Parachin // Microorganisms : MDPI, 2018. – V.6. – N 2. – P. 38.
3. Pan Y. Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins / Y. Pan, J. Yang, J. Wu, L. Yang, H. Fang // Front Microbiol., 2022. – V.13. – N 1. – P. 1–14.
4. Patent CN101487009A. Method for preparing vaccine for anti-HPV infection by pichia yeast expression system / Z. Gaoxia, Y. Jingyu, Z. Qianli, W. Jian, X. Yinghua, W. Ke. – ap. 22.07.2009.