

РАЗРАБОТКА СЪЕДОБНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ТОМАТА

Шерматов Ш. , Камбурова В. , Усманов Д. , Убайдуллаева Х. , Буриев З. ,
Абдурахмонов И.

Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистана
sshermatov@hotmail.com

В настоящее время по данным ВОЗ для профилактики COVID-19 одобрено 11 вакцин для неограниченного использования, 9 — для ограниченного использования, 175 кандидатных вакцин находятся на стадии клинических испытаний, из которых 11 — на стадии 4 клинических испытаний, 6 — на стадии 3 клинических испытаний, 9 — на стадии 2 и 2/3 клинических испытаний, 45 — на стадии 1 и 1/2 клинических испытаний, и 199 — на стадии доклинических исследований. Для разработки вакцин против COVID-19 применяются все возможные платформы, однако наиболее часто используются вакцины на основе ДНК, мРНК и белковых субъединиц. Большинство используемых и разрабатываемых на данный момент вакцин является инъекционными, а также требуют особых условий транспортировки, хранения и применения. Несмотря на длительную историю применения, данные системы имеют высокую стоимость и низкую безопасность для окружающей среды.

Снижение недостатков производства и применения рекомбинантных вакцин от коронавируса может быть достигнуто за счет использования так называемых растительных съедобных вакцин. К преимуществам съедобных вакцин относят простота производства и масштабируемости, удобство транспортировки и хранения, пероральный способ использования. К недостаткам можно отнести тот факт, что для создания «съедобной» вакцины необходимо использовать культуры, употребляемые в пищу без тепловой обработки. Учитывая вышеизложенное, в данной работе предпринята попытка разработать съедобную вакцину против COVID-19 путем трансформации томатов.

Для получения иммуногена для иммунизации мышей был сконструирован вектор экспрессии *pART27*, кодирующий последовательность гена *S1*, полученная на основании секвенированных геномов SARS-CoV-2, циркулирующих в узбекской популяции. Созданным генетическим вектором была трансформирована суспензия *A. tumefaciens*. Селекцию трансформированных агробактерий осуществляли на селективной агаризованной среде YEP, содержащей антибиотики канамицин (50 мг/л), рифампицин (20 мг/л) и спектиномицин (50 мг/л). Успешность трансформации агробактерии составила 96%. Далее суспензией трансформированных агробактерий была осуществлена агроинфильтрация плодов томата. *In fruit* трансформацию томатов осуществляли по модифицированным методам Yasmeeen et al. (2021) и Orzaez et al. (2006), используя штамм LB4404 *A. tumefaciens*. При этом проведение инъекции плодов томата через верхушку столбика приводило к накоплению инфильтрационного раствора в центральной пластинке, плаценте и околоплоднике. Полученные из подвергнутых трансформации семян проростки были проверены на присутствие в геноме *pART27* вектора, содержащего последовательность гена *S1* SARS-CoV-2. При этом было выявлено, что из 405 проростков ПЦР-положительными оказались 46.

Для подтверждения эффективности встраивания конструкции в геном томата был исследован уровень экспрессии гена *S1* SARS-CoV-2 у ПЦР-положительных образцов проростков томата. При этом было обнаружено, что из 8 ПЦР-положительных образцов у 6 образцов наблюдался значительный уровень экспрессии гена *S1* SARS-CoV-2, что позволяет предположить наличие синтеза антигенного белка. Для подтверждения предположения о синтезе иммуногена в клетках томата был проведен ИФА-анализ. Результаты анализа показали, что в образцах, в которых наблюдалась экспрессия гена *S1* SARS-CoV-2, был выявлен синтез белка *S1* в количестве от 3,55 мкг/мл до 14,1 мкг/мл.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об успешной трансформации плодов томата вектором *pART27*, содержащим последовательность гена *S1* SARS-CoV-2.

DEVELOPMENT OF TOMATO-BASED EDIBLE VACCINE

Shermatov S. , Kamburova V. , Usmanov D. , Ubaydullaeva K. , Buriev Z. ,
Abdurakhmonov I.

*The Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Tashkent
sshermatov@hotmail.com*

According to the World Health Organization, there are currently 11 COVID-19 vaccines approved for unrestricted use, 9 approved for restricted use, and 175 candidate vaccines in various stages of clinical trials. Among these, 11 are in Phase 4 trials, 6 in Phase 3, 9 in Phase 2 and 2/3, 45 in Phase 1 and 1/2, and 199 in preclinical stages. All available vaccine platforms are being utilized, with DNA, mRNA, and protein subunit vaccines being the most common. Most vaccines in use and development are injectable and require specific conditions for transport, storage, and administration. Despite their long history, these systems are expensive and pose environmental safety concerns.

To mitigate the drawbacks associated with recombinant coronavirus vaccines, the use of so-called plant-based edible vaccines could be a viable alternative. The advantages of edible vaccines include ease of production and scalability, convenience in transportation and storage, and oral administration. However, a significant challenge is that edible vaccines must be produced using crops that can be consumed raw. This study aims to develop an edible vaccine against COVID-19 through the transformation of tomatoes.

An expression vector, *pART27*, encoding the *S1* gene sequence derived from the genomes of SARS-CoV-2 circulating in the Uzbek population, was constructed for generating the immunogen. This genetic vector was used to transform an *Agrobacterium tumefaciens* suspension. Selection of the transformed *Agrobacterium* was performed on selective YEP agar medium containing kanamycin (50 mg/l), rifampicin (20 mg/l), and spectinomycin (50 mg/l), achieving a transformation efficiency of 96%. Subsequently, the transformed *Agrobacterium* suspension was used for agroinfiltration of tomato fruits. Tomato transformation was carried out using modified methods from *Yasmeen et al.* (2021) and *Orzaez et al.* (2006) with the *LB4404* strain of *A. tumefaciens*. Injection through the tomato fruit apex led to the accumulation of the infiltration solution in the central placenta and pericarp.

Seeds from the transformed tomatoes were germinated and analyzed for the presence of the *pART27* vector containing the *S1* gene sequence. Out of 405 seedlings, 46 were PCR-positive. To confirm the integration of the construct into the tomato genome, the expression level of the SARS-CoV-2 *S1* gene was assessed in PCR-positive seedlings. Among the 8 PCR-positive samples, 6 showed significant levels of *S1* gene expression, suggesting antigenic protein synthesis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to verify the synthesis of the immunogen in tomato cells. Results indicated that in samples expressing the *S1* gene, the *S1* protein was synthesized at concentrations ranging from 3.55 µg/ml to 14.1 µg/ml.

These results demonstrate the successful transformation of tomato fruits with the *pART27* vector containing the SARS-CoV-2 *S1* gene sequence.