

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии»

(ФГБНУ ВНИИСБ)

УДК 57.084.1

На правах рукописи

Шведова Анастасия Николаевна

Водное растение *Wolffia arrhiza* в качестве продуцента терапевтических
рекомбинантных белков

1.5.6 – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: ведущий
научный сотрудник лаборатории
биоинженерии растений ФГБУН НБС-
ННЦ РАН, кандидат биологических
наук Хватков Павел Алексеевич

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| Список сокращений | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ | 12 |
| 1.1 Биофарминг – прогрессивный метод получения терапевтических белков в растениях | 12 |
| 1.2 Использование растений для биофарминга..... | 16 |
| 1.2.1 Стратегии создания экспрессионных платформ | 16 |
| 1.2.2 Съедобные вакцины и перспективы их развития | 19 |
| 1.2.3 Рекомбинантные белки в биофарминге..... | 23 |
| 1.3 Агробактериальный метод трансформации растений..... | 27 |
| 1.4 Успехи генетической трансформации семейства <i>Legnaseae</i> | 30 |
| 1.5 Биологические особенности представителей семейства <i>Legnaseae</i> | 33 |
| 1.6 Перспективы использования рясковых в биофарминге | 36 |
| 1.7 Особенности культивирования <i>in vitro</i> растений <i>Wolffia arrhiza</i> | 38 |
| 1.8 Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (ГКСФ)..... | 40 |
| 1.9 Гирудин | 42 |
| 1.10 Использование биореакторов для растительного биофарминга | 45 |
| 1.11 Особенности культивирования рясковых в биореакторах | 46 |
| 1.12 Заключение по обзору литературных источников | 47 |
| 2.1 Материалы и методы | 50 |
| 2.1.1 Объекты исследования..... | 50 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.1.2 | Подготовка и приготовление сред | 50 |
| 2.2 | Молекулярно-генетический анализ трансгенных образцов вольфии..... | 50 |
| 2.2.1. | Гистохимический анализ активности гена <i>gus (uidA)</i> | 50 |
| 2.2.2 | Выделение тотальной растительной ДНК | 51 |
| 2.2.3 | ПЦР-анализ трансгенных растений..... | 51 |
| 2.2.4 | Визуализация продуктов ПЦР | 52 |
| 2.2.5 | Саузерн-блот анализ образцов содержащих целевые белки | 52 |
| 2.3 | Количественный анализ содержания белка..... | 53 |
| 2.3.1 | Выделение тотального водорастворимого белка | 53 |
| 2.3.2 | Проведение вестерн-блот анализа | 54 |
| 2.3.3 | ИФА (ELISA) Количественная оценка накопления гирудина и ГКСФ | 56 |
| 2.4 | Агробактериальная трансформация..... | 57 |
| 2.4.1 | Методика проведения транзientной агробактериальной трансформации | 57 |
| 2.4.2 | Методика проведения стабильной агробактериальной трансформации вольфии | 58 |
| 2.4.3 | Агробактериальный штамм и бинарные вектора..... | 59 |
| 2.4.4 | Векторные конструкции с целевыми белками гирудина и ГКСФ | 60 |
| 2.4.5 | Получение трансгенных линий (популяций) вольфии с целевыми генами | 62 |
| 2.5 | Расчет эффективности стабильной трансформации | 63 |
| 2.6 | Статистическая обработка данных..... | 63 |
| 2.6.1 | Сравнение нескольких средних по критерию Дункана..... | 64 |

| | |
|---|----|
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ..... | 65 |
| 3.2 Получение трансгенных регенерантов вольфии..... | 68 |
| 3.3 Исследование влияния регуляторов роста (2,4-D и ВА) на эффективность трансформации..... | 71 |
| 3.4 Анализ трансгенных растений <i>W. arrhiza</i> , содержащих гены гирудина и ГКСФ..... | 75 |
| 3.4.1 Анализ растений, трансформированных плазмидой pCamHIR | 75 |
| 3.4.2 Нарботка гирудина в растениях вольфии бескорневой | 77 |
| 3.4.3 Анализ растений, трансформированных плазмидой pCamGCSF | 79 |
| 3.4.4 Нарботка ГКСФ в растениях вольфии бескорневой | 83 |
| 3.5 Анализ накопления целового белка (ГКСФ) в культуральной среде..... | 85 |
| 3.6 Возможные перспективы вольфии бескорневой как потенциальной экспрессионной платформы..... | 86 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 89 |
| ВЫВОДЫ | 92 |
| БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК..... | 93 |

Список сокращений

2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

BA – 6-бензиламинопурин

gfp – зелёный флуоресцентный белок (green fluorescent protein)

gus – β -глюкуронидаза

Hyg – антибиотик гигромицин

Km – антибиотик канамицин

Rif – антибиотик рифампицин

SH – среда для культивирования вольфии (Шенка-Хильдебрандта)

YEB, LB – среды для культивирования агробактерии

ГКСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (hG-CSF)

ИФА (ELISA) – иммуноферментный анализ

ОРБ – общий растворимый белок

CHO – клетки яичника китайского хомячка (chinese hamster ovary)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Спрос на вакцинацию увеличился за последние несколько лет из-за увеличения заболеваемости не только вирусными, но и бактериальными инфекционными заболеваниями. Наиболее перспективными в настоящее время являются рекомбинантные вакцины (Schillberg S., 2021; Rader R.A., 2015; LeBlanc Z., 2020). В связи с чем возникает необходимость разработки экспрессионных систем, которые могли бы ускорить получение рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки в основном используются для терапии и включают: антитела, вакцины, ферменты, цитокины и факторы роста. Кроме того, острая необходимость в производстве рекомбинантных белков включает высокий спрос на промышленные ферменты и реагенты, используемые в исследованиях, включая антитела, используемые для идентификации и очистки белков (Rani D., 2024). Пандемия COVID-19 вызвала резкий рост спроса на вакцины и терапевтические средства, а стандартные системы производства (клетки млекопитающих, бактерий и дрожжей) не смогли в полной мере удовлетворить спрос на вакцины. Такая ситуация в фармацевтической промышленности говорит о недостатках цепочки «разработка-производство-поставка» для того, чтобы в короткие сроки удовлетворить нужды населения в биологических препаратах в чрезвычайных ситуациях (LeBlanc Z., 2020).

Одним из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии является получение растений-продуцентов разнообразных рекомбинантных белков человека и животных, имеющих медицинское и ветеринарное назначение (Rader R.A., 2015; Walsh G., 2018; Heenatigala P.P.M., 2020). Системы производства биопрепаратов на растительной основе к настоящему моменту достигли коммерческого применения благодаря возможности производить сложные гликозилированные молекулы со сравнительно низкими производственными затратами, высокой масштабируемостью и гибкостью производства. Чтобы стать эффективной

экспрессионной системой растения-продуценты должны обладать определенными свойствами: высокое содержание белка в тканях, высокая скорость роста, наличие высокой регенерационной способности в условиях *in vitro* и другие (Савельева Н.В., 2015; Dubey К.К., 2018; Schillberg S., 2021). Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. Перспективной растительной платформой могут стать растения семейства *Lemnaceae*. Растения этого семейства имеют небольшой размер, который позволяет культивировать данные растения в закрытых системах – биореакторах и имеют высокое содержание белка в тканях. Большинство видов содержат 15–45% белка, в зависимости от источника азота (Landolt and Kandeler, 1987) в процессе культивирования, благодаря чему рясковые используют в пищу людьми как высокобелковый продукт, широко применяют для кормления сельскохозяйственных животных (Appenroth К.Ж., 2017; Vog М., 2019). Такой ряд особенностей рясковых позволяет считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков.

Степень разработанности

В начале XXI века были получены первые трансгенные растения рода *Lemna* и *Spirodela*, экспрессирующие рекомбинантные терапевтические белки были получены (Stomp and Rajbhandary, 2000; Gasdaska, 2003). В 2008 году Rival с соавторами получили трансгенные растения *Spirodela oligorrhiza* экспрессирующие рекомбинантный аprotинин. На видах *Wolffia australiana* и *Wolffia globosa* была продемонстрирована транзientная наработка рекомбинантных белков (Boehm R. 2001; Kruse C. 2002; Friedrich A.S. 2005).

В 2015 году на базе нашей лаборатории Хватковым с соавт. впервые была продемонстрирована стабильная трансформация вольфии (вид *W. arrhiza*) (Khvatkov P. et al., 2015). Для переноса генетического материала в вольфию бескорневую первоначально использовался метод баллистической трансформации. Несмотря на высокий уровень транзientной экспрессии из-за

низкого уровня пролиферации трансформированных клеток данный подход не увенчался успехом. Наиболее интересные результаты были получены при помощи агробактериальной трансформации. Она, несомненно, обладает рядом преимуществ: относительной простотой и дешевизной, возможностью переноса больших фрагментов чужеродного генетического материала и его низкокопийная интеграция в растительный геном. В исследованиях было получено 4 трансгенные линии, устойчивые к антибиотику гигромицину и содержащие ген *uidA* (*gus*) (Khvatkov P. et al., 2015). Однако эффективность трансформации была довольно низка. Оптимизация условий трансформации, а также условий дальнейшего культивирования растений на питательной среде может позволить растениям вида *W. arrhiza* стать перспективным продуцентом терапевтических рекомбинантных белков или же выступить в роли «съедобной вакцины».

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования состояла в разработке экспрессионной платформы на основе водного растения вольфии бескорневой для наработки терапевтических рекомбинантных белков: гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и дисульфатогирудина-1.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Произвести оптимизацию транзientной трансформации вольфии для дальнейших исследований и возможности более быстрого получения стабильных трансформантов;
2. Интегрировать методом агробактериальной трансформации в геном *Wolffia arrhiza* конструкции с геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (hG-CSF);
3. Интегрировать методом агробактериальной трансформации в геном *Wolffia arrhiza* конструкции с геном дисульфатогирудина-1 (Hirudin);
4. Провести анализ полученных линий на предмет содержания рекомбинантных белков в тканях *Wolffia arrhiza*;

5. Установить, способна ли *Wolffia arrhiza* стать эффективным растением продуцентом в качестве экспрессионной платформы для наработки терапевтических белков.

Новизна и практическая значимость работы

Проведена оценка ряски вида *W. arrhiza* в качестве претендента на высокоэффективную растительную экспрессионную систему для наработки рекомбинантных белков. Впервые получены трансгенные растения вольфии бескорневой экспрессирующие гены терапевтических белков (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и гирудина).

Методология и методы диссертационного исследования

Диссертационная работа выполнена с использованием классических и современных методов культуры клеток и тканей, молекулярно-генетические и биохимические исследования проведены с использованием классических методов с применением сертифицированного оборудования. Подробно методология и методы исследования изложены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработка эффективной системы трансформации вольфии бескорневой. Подобрано оптимальное соотношение концентраций регуляторов роста, оптимизированы условия инокуляции (концентрация и тип агробактериального штамма, время кокультивации), которые повышают эффективность трансформации вольфии в 2 раза.
2. Впервые получены трансгенные линии вольфии, экспрессирующие рекомбинантный гирудин.

3. Впервые получены трансгенные линии вольфии, эффективно экспрессирующие гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (ГКСФ).
4. Приведена оценка технологического потенциала использования полученных линий вольфии для трансфера белка в среду для культивирования.
5. Утверждение о перспективности использования вольфии бескорневой в качестве экспрессионной платформы для наработки рекомбинантных белков.

Степень достоверности и апробации результатов

Результаты исследований представлены на: XIV и XV Молодежных научных конференциях, посвященных памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2014 и 2015 г); Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology. The 3rd International Conference, PlantGen, Novosibirsk, 2015; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, ИРНИТУ 85 (Иркутск, 2015); International Conference on Duckweed Research and Applications. 4th, Kerala, 2017; 18-й Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», ФГБНУ ВНИИСБ (Москва, 2018); VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019).

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из которых: 3 статьи в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, 9 тезисов докладов международных и российских конференций.

Работа выполнена в лаборатории генной инженерии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва, 127550 Россия.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа (116 стр.) состоит из введения, обзора литературных источников, раздела материалы и методы, описания и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы (186 источников), и включает 22 рисунка, также 5 таблиц по ходу изложения диссертационной работы.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю Хваткову П. А. за руководство, ценные советы, замечания и помощь; руководителю лаборатории Долгову С. В., всем сотрудникам лаборатории генной инженерии растений ВНИИСБ за помощь и дружескую поддержку, также всем соавторам по публикациям. Также большая благодарность моей семье, в частности мужу к.ф-м.н. Кузнецову К. А., за терпение и дополнительные советы при написании статей и диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.1 Биофарминг – прогрессивный метод получения терапевтических белков в растениях

В 1986 г Andrea Barta с соавторами показали, что с помощью трансгенных растений табака и подсолнечника можно производить химерный гормон роста человека (Barta A., 1986). Позже, в 1989 году, в трансгенных растениях табака был получен функциональный полноразмерный IgG1 мышей (Hiatt A. et al., 1989). Рекombинантный сывороточный альбумин человека был экспрессирован в трансгенных растениях картофеля и табака, а также в культурах клеток табака, полученных из трансгенной линии (Sijmons P.C. et al., 1990). В обоих исследованиях рекомбинантные белки содержали N-концевые сигнальные пептиды, обеспечивающие правильную укладку белков для повышения их стабильности, что приводило к более высоким уровням накопления в растительных тканях (Schillberg S. et al., 1999). Эти пионерские исследования положили начало биофармингу, что подразумевает использование растений в качестве платформы для наработки фармакологических белков. Несмотря на то, что обычное биофармацевтическое производство включает небольшое количество хорошо зарекомендовавших себя платформ, таких как бактериальная (*Escherichia coli*), дрожжевая (*Saccharomyces cerevisiae*), клетки яичника китайского хомяка (СНО), мышинные клетки NS0 и Sp2/0 и клетки эмбриональной почки человека (HEK293), было предложено и много различных растительных платформ, включая табак, картофель, томат, люцерну, сафлор, морковь, салат, клубнику, мох, ряску, кукурузу, пшеницу, рис и другие. К развитию отрасли растительного биофарминга привел ряд факторов, представляющие растительные платформы привлекательными. Прежде всего, в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка вирусами животных и прионами (инфекционными белками). По качеству продукции растительные платформы не сильно уступают животным системам, хоть есть незначительные

различия в процессе гликозилирования и фолдинга белков (Войнов Н.А., 2009) (рис. 1).

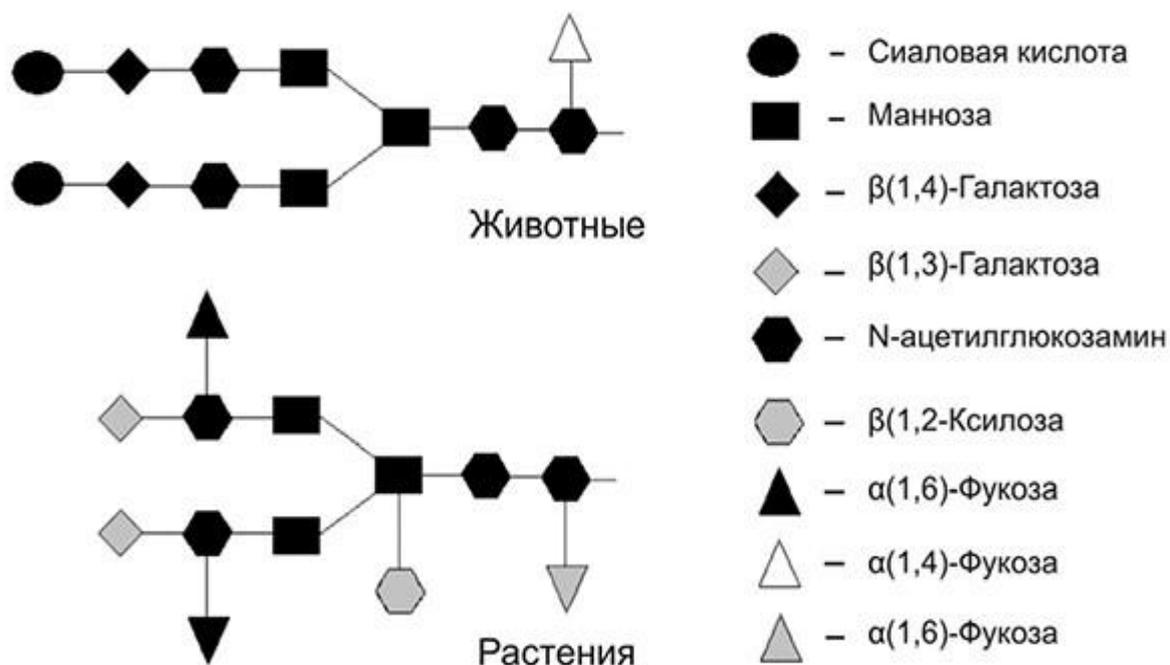


Рисунок 1. Общая схема гликозилирования белков в клетках животных и растений (Войнов Н.А., 2009)

Начиная с 2010 года отрасль биотехнологического производства рекомбинантных белков становилась все более привлекательной. Аналитика компаний по производству биотехнологических продуктов показывает, что данная отрасль прибыльна (Rader R.A. 2015, Walsh G. 2018, Biopharmaceutical Sector Market Update - January 2022 (torreya.com)). Лидирующее место по распространенности систем экспрессии рекомбинантных белков и антител, одобренных в настоящее время, занимают экспрессионные системы на основе клеток млекопитающих и бактерий (Rader R.A. 2015). Тем не менее, одним из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии становится получение растений-продуцентов разнообразных рекомбинантных белков человека и животных, имеющих медицинское и ветеринарное назначение (Walsh G., 2018; Heenatigala P.P.M., 2020). Растительные платформы могут стать

альтернативной системой для реализации современных потребностей в качественном и доступном рекомбинантном материале.

Несмотря на то, что гликозилирование в клетках высших растений сходно с клетками млекопитающих, имеются и отличия, которые могут повлиять на биологическую активность синтезируемых рекомбинантных белков в растительной системе. У растений гликопротеины имеют два углеводных остатка, не встречающихся у млекопитающих - $\beta(1,2)$ -ксилозу и $\alpha(1,6)$ -фукозу (рис. 1). Эти олигосахаридные остатки могут стать аллергенами для человека, поскольку в некоторых экспериментах в крови подопытных животных обнаруживались специфические иммуноглобулины IgE, вырабатываемые против растительных углеводных детерминант. Различия в гликозилировании у растений и животных могут быть особенно важны при использовании в медицине антител, синтезированных в растениях (Войнов Н.А., 2009). В настоящее время целое направление, такое как гликоинженерия способно решать проблемы, связанные с конформацией белков (Розов С.М. 2018).

Новаторская работа Strasser с соавторами в 2004 продемонстрировала, что растения переносят полное удаление остатков β -1,2-ксилозы и α -1,3-фукозы без каких-либо неблагоприятных последствий для роста или развития (Strasser et al. 2004). На основе этого исследования были успешно модифицированы N-гликаны в водном растении *Lemna minor* и *Nicotiana benthamiana* (Cox et al. 2006; Strasser et al. 2008). *N. benthamiana* используется академическими группами и компаниями по всему миру в качестве временной системы экспрессии для моноклональных антител, антигенов, Fc слитых белков, вирусоподобных частиц, используемых для терапии, профилактики и диагностики (Göritzer, K. & Strasser, R.2021). На растениях *Lemna minor* авторами (Cox et al. 2006) было продемонстрировано оптимизированное гликозилирование которое было не отличимо от клеток СНО в отношении термической стабильности, связывания антигена и электрофоретических свойств. Таким образом была показана возможность однородности гликозилирования у растений рясковых, а,

следовательно, повышая их преимущество как растительная экспрессионная платформа в плане простоты и безопасности производства рекомбинантных белков, а также повышая их функциональность.

Разнообразие видов растений, систем, методов экспрессии и стратегий получения белков означает, что подходящая платформа, вероятно, будет доступна для любого доступного белкового продукта. Однако растительные системы не лишены недостатков, например, часто низкий уровень экспрессии перенесенных генов или же протеолиз чужеродных белков в цитоплазме растительной клетки (Войнов Н.А., 2009). Также, для производства нужного белка приходится проводить сравнение различных растительных платформ чтобы подобрать наиболее подходящую в каждом конкретном случае. Данный процесс является трудоемким и требует много времени, а отсутствие стандартной платформы затрудняет оптимизацию производства и последующей обработки. Таким образом, становится очевидно, что требуется универсальная растительная экспрессионная платформа.

В настоящее время значительные усилия исследователей направлены на разработку методов экспрессии различных пептидов в трансгенных растениях. Важное внимание уделяется антибактериальным пептидам для защиты растений от бактериальных патогенов и получения новых антимикробных препаратов для биофармацевтических приложений, например, лактостатину (Cabanos et al. 2013), дермасептину (Yevtushenko and Misra 2012). А разработка методов экспрессии человеческого проинсулина (Boyhan and Daniell 2011; Yarbakht et al. 2015) и глюкагоноподобного пептида-I (Yasuda et al. 2005). В большинстве исследований выход целевого продукта был низким и колебался в пределах 0,5–10 мкг/г сырой массы растения-продуцента, что соответствовало тысячным долям процента от общего растворимого белка (Holaskova et. al. 2015).

С другой стороны, рекомбинантный аprotинин (полипептид, 58 аминокислотных остатков), как классический пример ингибитора сериновой протеиназы, накапливался в растениях на высоком уровне — до 9% от общего

количества белка в семенах кукурузы (Delaney et al. 2003; Karg and Kallio 2009), что свидетельствует о различных возможностях синтеза и накопления в растениях белковых молекул различного состава и/или массы.

1.2 Использование растений для биофарминга

1.2.1 Стратегии создания экспрессионных платформ

За последние несколько лет появилось множество эффективных систем экспрессии на основе растений, что привело к производству более 100 рекомбинантных белков включая гормоны, антигены, ферменты, антикоагулянтные пептиды, антитела и молекулярные транспортеры, были произведены в различных растительных системах с 1986 года (Heenatigala P. P. M., 2024). Для экспрессии чужеродных белков используется широкий спектр растений, а также различных типов растительных тканей, например, ткани листьев и стеблей различных видов и сортов табака (*N. benthamiana*, *N. tabacum*), картофеля, семян риса, кукурузы, моркови, бобов, бананов, томатов и клубники, а также *Arabidopsis thaliana* и люцерны (Fidan, 2024). Развитию данной области способствовала способность растений производить посттрансляционные изменения, которые обеспечивают надлежащее сворачивание и сохранение структурной и функциональной целостности этих белков.

Существует несколько стратегий экспрессии в растительных платформах: создание стабильных (постоянных) систем экспрессии – ядерная и хлоропластная генная трансформация, транзистентная (временная) наработка продукта, культура клеточной суспензии (Bharathi J.K. 2024). Каждая стратегия имеет свои преимущества и недостатки с точки зрения экспрессии белка, масштабируемости, эффективности производства и нормативных требований.

Стабильная наработка рекомбинантных белков имеет неоспоримые преимущества, такие как: наследственная экспрессия рекомбинантных белков,

экономически эффективное производство в больших масштабах, близость к целевым рынкам благодаря широкому выращиванию культур (например риса или кукурузы), у некоторых растений (ряски) доступен выход белковых продуктов в среду, что также сокращает время и средства на очистку, либо полное ее отсутствие (в качестве съедобных препаратов не только для животных, но также для людей), а самое важное преимущество – возможность долгосрочного производства рекомбинантных белков. Для трансформации хлоропластов характерными преимуществами является: наследование по материнской линии у большинства видов, предотвращение утечки трансгена посредством амфимиксиса. Главный недостаток данной стратегии это – длительное время для получения стабильно трансформированных растений. Также сюда можно отнести возможность скрещивания с местными видами и сельскохозяйственными культурами, возможность ауткроссинга, ограниченная масштабируемость производства, а также проблемы регулирования бела с течением времени и послеуборочной обработки.

Транзиентная экспрессия в свою очередь позволяет за короткий промежуток времени наработать достаточное количество рекомбинантных белков, что позволяет оперативно реагировать на чрезвычайные ситуации, что делает такую стратегию развития очень отзывчивой на восполнение производственных пробелов в ответ на появление новых последовательностей антигенов, также довольно-таки большая гибкость в производстве различных типов белков. К минусам можно отнести ограниченную масштабируемость производства, проблемы с самим производством таких белков, их очистке, стабильности и самим уровнем экспрессии. Такой путь не подходит для долгосрочного производства некоторых белков требующих постоянной экспрессии.

Клеточная суспензия позволяет вырабатывать ценные биоактивные соединения у некоторых видов растений. Простота масштабирования, нормативные требования, упрощенный процесс очистки благодаря отсутствию

необходимости разрушать ткани и низкому содержанию загрязняющих белков делают эту стратегию развития весьма привлекательной для производства ценных рекомбинантных. И тем не менее такая система не лишена своих недостатков. Белки, полученные в культурах клеточных суспензий, не всегда правильно сворачиваются и подвергаются необходимым посттрансляционным модификационным изменениям, что приводит к снижению функциональности или эффективности таких белков. Длительное культивирование клеточных суспензионных культур может привести к генетическим изменениям или дрейфу клеточных линий, что может негативно повлиять на уровень экспрессии белка, его стабильность или другие характеристики. Рекомбинантные белки, экспрессируемые в растительных клеточных суспензиях, не всегда эффективно секретируются в среду, что приводит к колебаниям в количестве получаемого белка плюс, часть белка может оставаться в клетках, что влияет на общую производительность и качество продукта.

Биофармацевтические препараты обладают рядом преимуществ. Например, они редко приводят к негативным последствиям, демонстрируют высокую селективность и активность по сравнению с традиционными методами лечения (Kesik-Brodack M., 2018). Рекомбинантный человеческий инсулин, изготовленный из бактерий, был самым ранним фармацевтическим продуктом, разработанным для рынка в 1982 году (Bharathi J.K. 2024). После экспрессии интерферона, mAb, сывороточного альбумина и слитого белка hGH (гормон роста человека) был продемонстрирован потенциал растений для фармацевтического производства.

Растительные системы делят на несколько основных терапевтических групп, например, вакцины, антитела и другие лекарства. Исследования генетически модифицированных растительных вакцин ведутся уже около 30 лет. Также можно существовать еще несколько направлений использования вакцин. Одно из таких создание съедобных вакцин – когда растение употребляется в целом виде без выделения и очистки целевого продукта. Другое – получение

антигенов, требующих очистку и выделение из растительных тканей для последующего введения инъекции. Важно отметить, что непосредственное получение любых необходимых рекомбинантных белков (трипсин, человеческий внутренний фактор активирующий витамин В12, липаза, инсулин, лактоферрин, коллаген и т. д.) актуально для фармацевтической промышленности.

1.2.2 Съедобные вакцины и перспективы их развития

Одним из интересных направлений для биофарминга являются съедобные вакцины. Употребление вакцины в пищу, как способ иммунизации, является самым безопасным и доступным. Преимуществом вакцин на растительных платформах является то, что антигены, экспрессируемые в растениях, защищены растительными клеточными стенками от протеолиза при прохождении пищеварительного тракта и могут быть легко доставлены к клеткам слизистой оболочки кишечника (Firsov A. et al., 2015). А также устраняется необходимость в извлечении и очистке рекомбинантного продукта. Пероральные вакцины не требуют тщательной очистки и стерильных условий, необходимых для инъекционных вакцин, а процедуры последующей обработки, описанные для пероральных вакцин растительного происхождения, варьируются от простой гомогенизации или минимальной обработки растительного материала до частичной очистки (Schwestka J., 2020) Биосовместимые растительные компоненты, такие как микрочастицы крахмала тоже изучались в качестве адъювантов для вакцин (Rydell & Sjöholm, 2004; Stertman, 2006). Механизм иммунизации такими вакцинами основан на способности антигенов макрофагов тонкого кишечника млекопитающих активировать компоненты иммунной системы и специфически взаимодействовать с факторами иммунитета.

В результате представления В-клетками антигена на поверхности антигенпредставляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты, синтезирующие

специфические к антигену антитела, которые в свою очередь транспортируются на поверхность слизистых оболочек, где они связываются с чужеродными агентами и препятствуют их проникновению в организм (Walmsley and Arntzen, 2000). (Рис.2).

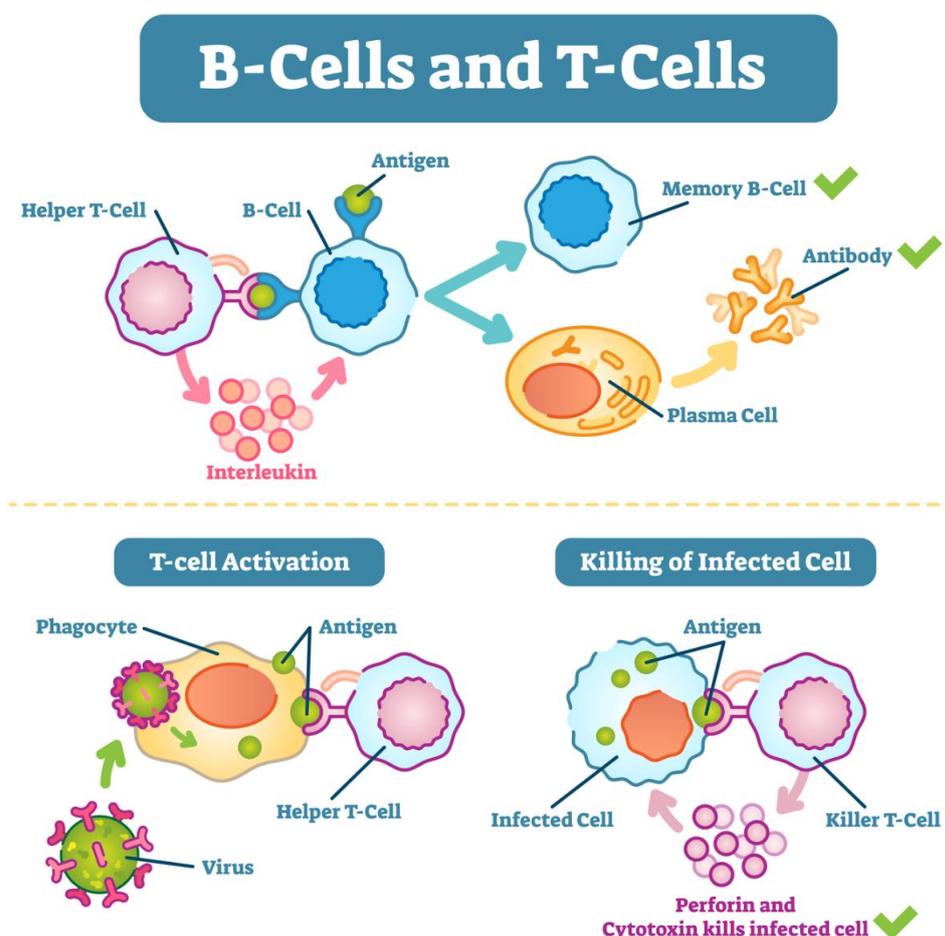


Рисунок 2. Схематическое изображение активации Т-лимфоцитов-хэлперов и дальнейшего клеточного ответа

(<https://kaleidoscopefightinglupus.org/lupus-b-cells-t-cells-and-the-immune-system/>)

Концепция съедобных вакцин была сформулирована в 1989 году Niatt с соавторами. В 1990 году Arntzen представил концепцию использования трансгенных растений для производства и доставки субъединичных вакцин. Было показано, что производство съедобных вакцин осуществимо (Kurup M. V., 2020). А уже в 1992 году в работе Mason с соавторами (1992) была показана эта возможность на примере растений табака, экспрессирующих антиген вируса гепатита В.

Съедобные вакцины представляют лучший выбор преимущественно для развивающихся стран, поскольку они рентабельны, легко вводятся, не требуют хранения и безопасны для биоразнообразия.

Пищевые вакцины обеспечивают активность слизистых оболочек наряду с гуморальным иммунитетом. Чаще всего в качестве модельных съедобных вакцин используют растения: картофель, рис, морковь, бананы, табак, томат и люцерну.

В 1998 году были получены растения картофеля, продуцирующие В-субъединицу холерного анатоксина. Исследователи давали этот картофель мышам и выявили у них выраженную защиту при инфицировании их холерой (Tacket C.O., 1998). Аналогичная вакцина против кори была получена в табаке (Arakawa T., 1998). В растениях картофеля возможно производить вакцины против столбняка, дифтерии, гепатита В и вируса Норуолк (Mason, H. S., 1996; Chikwamba R. K., 2003; Concha C., 2017).

Основным преимуществом производства съедобной вакцины из картофеля является легкость трансформации и размножения данной культуры в условиях *in vitro*. Нет необходимости в холодильниках для хранения, но одним из основных недостатков является любая кулинарная термическая обработка, приводящая к денатурации антигенов.

Трансгенные растения обычно экспрессируют только небольшую антигенную часть патогена или токсина, тем самым избегая рисков инфекционной токсичности и снижая вероятность возникновения побочных реакций (Oszvald M., 2007).

На базе томата впервые была создана эффективная вакцина против острого респираторного синдрома, атипичной пневмонии, вызванной коронавирусом. Листья, стебли, плоды и другие ткани обладают способностью экспрессировать белки СТ-В из токсина *Vibrio cholera* В (Zhang X., 2006). Томаты также использовались для экспрессии HBsAg (поверхностный антиген вируса гепатита В). Была разработана эффективная вакцина против болезни Альцгеймера путем экспрессии бетаамилоидных белков. Вакцины против пневмонии, септицемии и

бубонной чумы были наработаны в томатах. Данная культура быстро растет и может широко культивироваться, а высокое содержание витамина А в помидорах может повысить иммунный ответ, но хранение плодов требуют особых условий, что снижает привлекательность томата как платформы для биофарминга (Lou X. M., 2007; Srinivas, L., 2008). Однако, пандемия, вызванная COVID-19 обновила спрос на растительные вакцины. Не так давно вакцина от COVID-19, произведенная на основе табачных растений (Medicago Inc., Канада), была одобрена Министерством здравоохранения Канады для экстренного использования (Cameron, 2022). Buriev Z.T. с соавторами в 2024 году отметили, что съедобные вакцины на растительной основе, обеспечивают двухуровневую защиту от коронавируса (SARSCoV-2), превосходят используемые в настоящее время парентеральные типы вакцин, которые преимущественно вызывают системный иммунный ответ. Авторами было показано, что трансгенный генотип томата (ТОМАВАС), который стабильно синтезировал антигенный белок S1 SARS-CoV-2 при двухкурсовом кормлении мышей $\approx 5,4$ мкг/мл обеспечивал положительную тенденцию к снижению заболеваемости данной инфекцией. Серьезных побочных эффектов у мышей не наблюдалось. (Buriev Z.T., 2024)

Для повышения перспективности трансгенных растений в качестве съедобных вакцин можно производить наработку белка в естественных запасающих тканях растений. Это гарантирует стабильность белка, что снижает затраты, связанные с хранением. Исследования Oszvald M. на рисе (*Oryza sativa*) показали, что трансгенный рис, содержащий LTВ (В-субъединица термолабильного энтеротоксина *Escherichia coli*), слитый с белком PEDV (вируса эпидемической диареи свиней) действует как белок-носитель и адъювант, а также как вакцина. Из-за использования промотора, специфичного для эндосперма в исследовании, накопление белка наблюдалась только в эндоспермах трансгенных семян риса. В данном исследовании было продемонстрировано, что растения как система экспрессии рекомбинантных белков способна генерировать значительное

количество антигена, что, позволяет успешно разработать съедобную вакцину (Oszvald M., 2007).

Трансгенные растения обычно экспрессируют только небольшую антигенную часть патогена или токсина, тем самым избегая рисков инфекционной токсичности и снижая вероятность возникновения побочных реакций (Oszvald M., 2007).

1.2.3 Рекомбинантные белки в биофарминге

Вакцины на растительной основе сравнительно легче производить, в то время как для обычного производства вакцин требуются очень сложные и дорогостоящие технологии массового производства, как в случае с культурами клеток млекопитающих и микроорганизмов. К сожалению, массовому производству пероральных вакцин препятствуют некоторые факторы, такие как сложность прохождения различных клинических фаз испытания вакцин. Вакцину, полученную именно из трансгенных растений, должно одобрить общество, так как есть некоторые мнения, например, что генетически модифицированные продукты вредят обществу, а также окружающей среде (Schillberg S., 2021). При выращивании растений для производства съедобных вакцин необходим тщательный мониторинг, так как существует вероятность перекрестного опыления между генетически модифицированными и не модифицированными растениями. Поэтому необходимо создавать условия от разработки вакцины и прохождения всех уровней клинических испытаний, до реального выпуска препаратов. Тем не менее, клинические испытания с группами риска уже ведутся в некоторых лабораториях. Определение общего иммунного ответа на пищевые вакцины растительного происхождения имеет первостепенное значение. Возможно, в ближайшем будущем биофармацевтика выйдет на лидирующую роль промышленного производства вакцин на основе рекомбинантных белков, полученных из растений (Schillberg S., 2021).

Технологии растительного биофарминга привлекают внимание исследователей во всем мире из-за постоянного роста спроса на терапевтические белки с точки зрения качества, количества и разнообразия. Человеческий сывороточный альбумин (hSA), инсулин и антитела, нейтрализующие ВИЧ, являются примерами фармацевтических препаратов растительного происхождения, которые представлены на международных рынках. Из-за широкой распространенности сахарного диабета, в том числе из-за значительного дефицита предложения на рынке в Азии, человеческий инсулин пользуется большим спросом. Этот дефицит инсулина мог бы быть восполнен за счет растениеводства по цене, которую могли бы позволить себе диабетики в этой области (Bharathi J.K. 2024). Полученный из риса hSA под названием Optibumin был произведен Ventria Bioscience, и он уже добился успеха (Bharathi J.K. 2024).

Наиболее широкое применение биофарминг нашел в США. Согласно прогнозу журнала «Plant-based Biologics Market Report» (Plant-based Biologics Market Size 2031 | Revised in a New Report (researchdive.com)) объем мирового рынка биологических препаратов на растительной основе к 2031 году составит примерно 183 млн долларов США и будет расти со среднегодовым темпом роста 4,8% в течение прогнозируемого периода с 2022 по 2031 год. Таким образом, рынок растительных экспрессионных систем будет увеличиваться, хотя уже сейчас составляет примерно четверть от общей биофармацевтической промышленности. На сегодняшний день ряд препаратов на основе суспензионных культур каллуса табака, уже используется для вакцинации животных. Также, при помощи биофарминга производятся целые группы белков: антитела, гормоны, структурные и транспортные белки, иммуномодуляторы и другие (Sohrab S. S., 2017). В качестве примера в Таблице 1 приведены несколько наиболее востребованных и допущенных к производству вакцин из суспензионных культур клеток табака.

Один из самых успешных препаратов на растительной основе сегодня это зарегистрированный в 2012 году компанией Protalix Biotherapys of Israel препарат Elelyso/Uplyso. С помощью генной инженерии были получены трансгенные клетки

моркови, производящие талиглюцеразу альфа для лечения Болезни Гоше (Zimran, A. 2011). Производственная система основана на биореакторе и требует более низких первоначальных инвестиций и эксплуатационных расходов по сравнению с системами на основе клеток млекопитающих.

Таблица 1 Допущенные к использованию вакцины

| Антиген | Трансгенные растения | Фаза клинических испытаний |
|--|-------------------------|--|
| Newcastle disease virus (Болезнь Ньюкасла) | Суспензия клеток табака | Одобрено Министерством сельского хозяйства США (применяется на практике) |
| Personalized anti idiotypе ScFVs (антитела) | Суспензия клеток табака | Фаза 1 (транзиентная экспрессия) |
| H5N1 influenza («птичий грипп») | Суспензия клеток табака | Используется для вакцинации в Канаде |
| Антитела HBsAg scFV (Anti-HBsAg scFV) | Суспензия клеток табака | Доступно для вакцинации |
| Поверхностный антистрептококковый антиген (Anti-Streptococcus Surface antigen I/III) | Суспензия клеток табака | Одобрено EU (Евросоюзом) Проходит заключительные фазы испытаний |

Другая компания Era Biotech в Испании, которая вывела на рынок препарат под торговой маркой Zera® вырабатываемый в листьях *N. benthamiana*. Препарат состоит из сокращенной формы γ -зеина. Происходит слияние N-концевой последовательности запасяющего белка кукурузы γ -зеина с другими белками индуцирующие образование белковых телец, которые в дальнейшем используются для биоинкапсуляции рекомбинантных белков непосредственно в растительном организме-хозяине.

Эти белковые тела на основе γ -зеина могут использоваться для инкапсуляции белков и обладают иммуностимулирующими свойствами, что полезно для доставки вакцин (Zimran A. et al, 2020)

Важно отметить, что к настоящему моменту методами биофарминга на основе стабильно трансформированных растений разрабатывается несколько десятков вакцин медицинского и ветеринарного назначения. Это, в частности, вакцины против бешенства, различных изолятов ротавируса, энтеротоксичных штаммов *Escherichia coli*, холеры, чумы и многих других патогенов (Giorgi et al., 2010; Scotti and Rybicki 2013). Многие из них уже проходят различные этапы клинических испытаний. Это, в первую очередь, вакцины против эпидемических штаммов вируса гриппа типа А (фазы I и II клинических испытаний (Landry et al., 2010; Shoji et al., 2011), гепатита В (Pniewski 2013) и холеры (Takeyama et al., 2015). Вакцина ветеринарного назначения против ньюкаслской болезни птиц из растительных источников экспрессии уже разрешена к применению. Более того в растениях получен экспериментальный биологический препарат ZMapr, разрабатываемый для лечения лихорадки Эбола, состоящий из трех моноклональных антител, которые предотвращают распространения болезни в организме. Сейчас препарат находится на второй фазе клинических испытаний (PREVAIL II ClinicalTrials.gov number, NCT02363322). Из белков медицинского назначения у производителей наиболее популярны инсулин, лизоцим, лактоферрин, коллаген, липаза, антитела, вакцины и др. Трипсин, произведенный в трансгенных растениях, уже можно купить у компании Sigma.

Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. Перспективной растительной платформой могут стать растения семейства *Legnaseae*. В издании Plant-based Biologics Market (researchdive.com) отмечается, что именно рясковые открывают наиболее перспективный рынок биопрепаратов на растительной основе. Ряски используются в качестве модельных растений для изучения генетики, физиологии растений, мониторинга окружающей среды и

экологии, а также являются инструментом для поиска противомикробных химических веществ. Особенности рясковых (растения семейства *Legnaseae*), такие как высокая скорость прироста биомассы, высокое содержание белка в тканях, малый размер, позволяет считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков (Plant-based Biologics Market Size 2026 (researchdive.com); Stomp A.M. 2000; Gasdaska J.R. 2003; Friedrich A.S. 2005; Khvatkov P. 2015; <https://www.who.int/home>).

Очень важны вопросы безопасности в обращении с антителами, получаемых из растительных платформ. Исследователями проводится комплексная оценка риска вирусной безопасности с учетом таких факторов, как сырье, технологические средства, оборудование, условия окружающей среды и другое. Меры контроля качества применяются на протяжении всего производственного цикла, включая использование сертифицированного сырья, операции в контролируемых условиях и этапы удаления вирусов, такие как нанофильтрация (Bharathi J.K. 2024). В ходе первой фазы клинических испытаний на людях основное внимание уделяется оценке безопасности и реактогенности моноклональных антител растительного происхождения при введении препарата. Поэтому необходима тщательная оценка безопасности, контроль качества и соблюдения нормативных требований при производстве и использовании антител растительного происхождения.

1.3 Агробактериальный метод трансформации растений

Агробактерии являются почвенными фитопатогенными бактериями семейства *Rhizobiaceae*, которые также включают азотфиксирующие симбиотические бактериальные роды, такие как *Rhizobium* и *Sinorhizobium*. (Zupan, 2000). За прошедшие годы анализы, основанные на новых таксономических критериях, включая сравнение последовательностей 16S РНК и полных последовательностей генома некоторых штаммов, указали на близкое

родство этих родов. Они настолько близки, что некоторые систематики ставят под сомнение уместность различия между *Agrobacterium* и *Rhizobium* и предлагают отменить это различие и перегруппировать эти виды под названием рода *Rhizobium*. Однако название *Agrobacterium* попрежнему используется в большинстве публикаций и приложений по почвенной микробиологии, физиологии растений, а также молекулярной и клеточной биологии растений (Lacroix B. and Citovsky V., 2013). Классификация различных видов *Agrobacterium* основывалась на их фитопатогенных свойствах. Первоначально было описано три вида: *A. tumefaciens*, способный индуцировать корончатые галлы на широком спектре двудольных растений; *A. rhizogenes*, вызывающий заболевание косматый корень; и нефитопатогенный штамм *A. radiobacter*. Позднее были выделены другие виды *Agrobacterium*, которые имели весьма ограниченный круг хозяев и индуцировали пролиферацию растительных клеток лишь у некоторых видов растений. Так было с *A. vitis*, специфичным для виноградной лозы, *A. Rubi*, довольно специфичным для некоторых *Rubiaceae*, и *A. larrymoorei*, выделенным из *Ficus benjamina*. Эта классификация, однако, стала недействительной, когда было продемонстрировано, что фитопатогенность и круг хозяев агробактерий обусловлены наличием крупных трансмиссивных плазмид, называемых «Ti-плазмиды» (опухолеиндуцирующие) для *A. tumefaciens* и «Ri-плазмиды» (корнеиндуцирующие). С появлением секвенирования генома и новых методик изучения метаболических путей различные изоляты *Agrobacterium* были сгруппированы в три таксономических кластера или биовара, которые в конечном итоге можно было бы считать родами. I кластер - *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Плазмиды кольцевой хромосомы вторичной линейной хромосомы), II кластер *Agrobacterium radiobacter* K84 (ифаплазмиды с кольцевой хромосомой 4) и III кластер *Agrobacterium vitis* S4 (Плазмиды 5-й кольцевой хромосомы вторичной кольцевой хромосомы). Некоторые штаммы содержат дополнительные плазмиды, такие как pTar, которые несут гены, необходимые для использования тартрата, в избытке

содержащегося в виноградной лозе, в *A. vitis* S4. Данные секвенирования подтвердили родство *Agrobacterium* и *Rhizobium*. В частности, кольцевые хромосомы (но не другие генетические элементы) демонстрируют значительную коллинеарность нуклеотидов и сохранение порядка генов между этими видами, поддерживая мнение, что *Agrobacterium* и *Rhizobium* имеют общих предков, которые разошлись после приобретения плазмид, придающих патогенность или симбиоз, соответственно (Lacroix B. and Citovsky V., 2013).

В конце 1970-х годов было обнаружено, что фенотипы растений, индуцируемые *Agrobacterium* обусловлены переносом определенного сегмента ДНК из бактерии в растительную клетку называемого Т-ДНК (от англ. Transferred – перенесенная). После стабильной интеграции в растительный геном элемент Т-ДНК кодирует растительные гормоны, которые приводят либо к недифференцированным опухольям, либо к разрастанию корней. (Montagu Van M., Zambryski P., 2017).

Ti-плазмиды имеют размеры порядка 200-250 kb и стабильно сохраняются в агробактериях. Т-ДНК может доставляться в клетки эукариот и экспрессироваться в них. На концах Т-ДНК находятся прямые высоко консервативные повторы (25 н. п.), составляющие так называемые левый (LB – left border) и правый (RB – right border) пограничные районы, которые необходимы для вырезания ее из состава плазмиды и интеграции в геном растений. Любая последовательность ДНК (не более 23 kb), помещенная между этими границами, может быть перенесена в растительную клетку. Также в состав Ti-плазмиды входят: Т-ДНК; онкогены (onc), ответственные за конститутивный синтез ауксинов и цитокининов; гены, кодирующие синтез и утилизацию опинов; локусы, контролирующие размножение плазмиды в бактериальной клетке, а также vir-область, несущая семь основных локусов: virA, virB, virC, virD, virE, virG и virH и отвечающая за перенос Т-ДНК в клетки растения (Ноекета, 1984).

Вектора для трансформации растений на основе Ti-плазмид агробактерий должны содержать следующие структурные элементы:

- последовательности правой и левой границы T-ДНК, а также последовательности, необходимые для переноса и встраивания области T-ДНК в геном растительной клетки;
- последовательность гена селективного маркера, что позволит проводить селективный отбор трансгенных растений. В качестве селективного маркера могут использоваться гены устойчивости к антибиотикам (*nptII* — устойчивость к канамицину, *hpt*-устойчивость к антибиотику гигромицину), ген *bar* (устойчивость к гербициду фосфинотрицину (BASTA) и ген ALS (устойчивость к гербициду хлорсульфоруону), ген бета-глюкуронидазы (фермент расщепляющий субстрат X-Gluc) и ряд других;
- последовательности, облегчающие встраивание целевого гена (полилинкерные последовательности, интроны, промоторные и терминаторные последовательности);
- сайты инициации для репликации в бактериальных клетках.

1.4 Успехи генетической трансформации семейства *Legnaseae*

Растительные системы являются перспективными экспрессионными платформами для наработки рекомбинантных белков. А поскольку в последние годы спрос на фармакологические белки увеличивается, необходимо правильно подобрать систему для наработки белков, которая будет отвечать следующим требованиям: биобезопасность производства, высокое качество и низкая стоимость продукции, легкость культивирования и высокая скорость прироста биомассы продуцента, предпочтительное накопление продуктов белкового синтеза (Mett et al. 2008). Поэтому при выборе объекта, который будет использован как платформа для получения вакцин необходимо, предусмотреть возможность крупномасштабного круглогодичного производства в полностью контролируемых условиях. Этим

требованиям в большей степени удовлетворяют растения семейства Рясковые, у которых наблюдается большая прогрессия размножения (удвоение биомассы за 1–6 суток) при малых размерах самого растения и высокое содержание белков в сухой массе (до 45%). Наряду с высоким содержанием белка ряски обладают высокой экологической пластичностью и нетребовательностью к питательным средам, что позволяет получать большое количество биомассы при относительно небольших затратах и в контролируемых условиях.

Основные усилия в области генной инженерии *Lemnaceae* были направлены на получение растений-продуцентов для производства рекомбинантных белков различного функционального назначения, в первую очередь медицинского. В настоящее время уже получены растения, экспрессирующие моноклональные антитела, вирусные и бактериальные антигены, различные терапевтические и промышленные белки. Их биологическая активность была подтверждена, и начались исследования в области получения и очистки целевых белков.

Первые работы по генетической трансформации рясковых были опубликованы в 1998 году. Edelman M. были получены первые растения *Spirodela punctata* стабильно экспрессирующие ген *gus*. (Edelman M. et al. 1998). В 2001-2005 годах были опубликованы работы, посвященные другим представителям растений семейства рясковые, таких как *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Wolffia columbiana*, *Wolffia globosa*. С этими видами были получены не только растения с транзientной экспрессией, но еще и стабильные линии, экспрессирующие ген *gus*. Первые стабильные линии с генами интерферона человеческого гормона роста Fab фрагментов и моноклональных антител были получены в 2003 году Gasdaska J.R. В 2015 на *Lemna minor* был получен слитый ген пептида антигенной детерминанты H5N1 вируса птичьего гриппа M2e – β-глюкуронидаза (Firsov et al., 2015, Firsov et al., 2018). Ниже в Таблице 2 приведены примеры работ по стабильной генетической трансформации рясковых.

Таблица 2 Работы по стабильной генетической трансформации *Lemnaceae*

| Вид | Трансформация | Авторы |
|---|---|--|
| <i>Spirodela punctata</i> | Стабильные линии с геном <i>gus</i> | Edelman M. et al. 1998 |
| <i>Spirodela oligorrhiza</i> | Стабильные линии с геном <i>gfp</i> | Vunsh R. et al. 2007 |
| <i>Spirodela oligorrhiza</i> | Стабильные линии с aprotinin synthetic gene | Rival S. et al. 2008 |
| <i>Lemna gibba</i> <i>Lemna minor</i> | Стабильные линии с генами <i>gus</i> , р-гемоглобина и Р450-оксидазы | Stomp A.M. and Rajbhandari N. 2000 |
| <i>L. gibba/L.minor</i> <i>Lemna minor</i> | Стабильные линии с геном <i>gus</i> | Yamamoto Y.T. et al.2001 Mourenets L.Yu. and Dolgov S.V. 2002 |
| <i>Lemna minor</i> | Стабильные линии с генами интерферона, человеческого гормона роста, Fab фрагментов и моноклональных антител | Gasdaska J.R. et al. 2003 |
| <i>Lemna minor</i> | Стабильные линии с геном <i>bar</i> | Gaydukova S.E. et al., 2008 |
| <i>Lemna minor</i> | Слитый ген пептида антигенной детерминанты H5N1 вируса птичьего гриппа M2e – β-глюкуронидаза и В субъединицей рицина в качестве адъюванта | Firsov et al., 2015 Firsov et al., 2018 |
| <i>Lemna minor</i> | Получение растений ряски с геном гирудина и βглюкуронидазы | Kozlov et al., 2018 |
| <i>Lemna minor</i> | Интерлейкин 17В (<i>chIL-17B</i>) в качестве адъюванта для мукозальной вакцины | Tan, X., 2022 |
| <i>Lemna aequinoctialis</i> | Редактирования генома на основе CRISPR/Cas9 | Liu et al., 2019 |

| | | |
|------------------------|--|-----------------------|
| <i>Lemna minor</i> | Линии с генами гирудина и β -глюкуронидазы | Firsov et al., 2019 |
| <i>Wolffia arrhiza</i> | Стабильные линии с геном <i>gus</i> | Khvatkov et al., 2015 |

1.5 Биологические особенности представителей семейства *Lemnaceae*

Ряски — однодольные растения, принадлежащие к семейству *Lemnaceae*, которое состоит из пяти родов (*Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffia* и *Wolffiella*) и 37 видов. *Lemnaceae* объединяет водные, свободноплавающие, большей частью многолетние, травянистые самые маленькие цветковые растения в мире (Landolt E., 1986; Wolff P., 1992). (Рис. 3). Размножаются ряски преимущественно вегетативно и способны удваивать массу популяции за 1–6 суток, а удвоение количества листецов происходит за 2–3 суток (Armstrong and Thorne, 1984, Li J. et al., 2004, Ziegler et al., 2015). Экспоненциальное размножение ряски приводит к высокой скорости роста биомассы. Ряска способна адаптироваться к широкому диапазону рН, а оптимальный рН для роста составляет 4,5~7,2. Ряска также может выживать при температуре от 2 до 35 °С. Эти свойства способствуют ее широкому распространению в естественных водоемах. Она растет на рисовых полях, прудах, озерах и других статичных водоемах. В результате гидрофильной эволюции рясковые достигли крайней степени редукции всех своих органов, поэтому по простоте строения они занимают первое место среди цветковых растений. (Kuehdorf and Appenroth, 2012).

Растения этого семейства формируют один листоподобный орган (от 0.3 мм до 12 мм), называемый листецом (Li et al., 2004). Листецы рясковых одиночные или соединены короткими, или удлиненными ножками, образованными суженной частью листеца, в небольшие группы по 2 или более либо в цепочки. Они представляют собой симметричную или асимметричную, большей частью зеленую пластинку, плоскую или уплощенную, реже сильновыпуклую с адаксиальной стороны (Landolt E. 1986; Wolff P., 1992; Les D.H. et al. 2002; Roche J. et al., 2016).

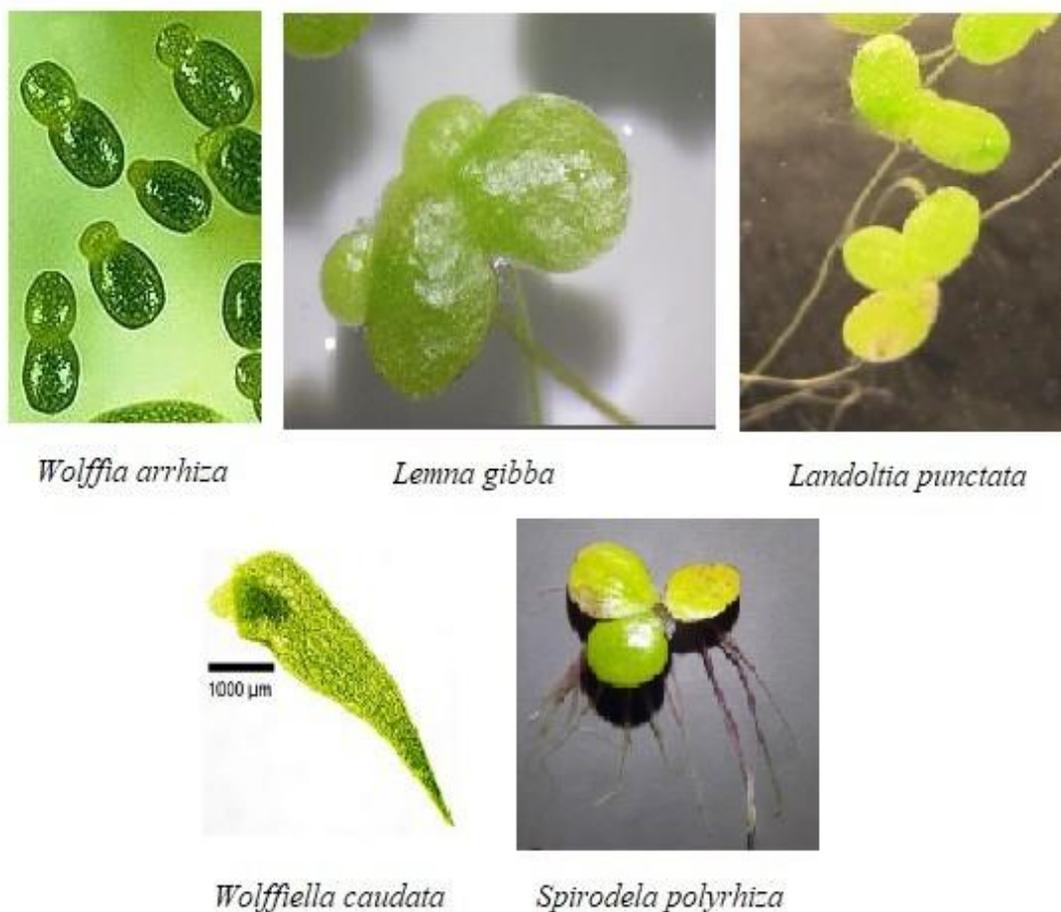


Рисунок 3. Представители семейства Рясковые

Листецы состоят, в основном, из клеток хлоренхимы, разделенных большими межклеточными полостями, заполненными воздухом или другим газом, что обеспечивает плавучесть растения (Landolt E., 1986; Wolff P., 1992; Leng et al., 1995). Проксимальная (базальная) часть листеца *Lemna* и *Spirodela* расщеплена двумя боковыми кармашками, в которых закладываются вегетативные почки, дающие начало дочерним листецам при вегетативном размножении. Иногда в одном из кармашков развивается соцветие, вначале окруженное покрывалом (Armstrong and Thorne, 1984). У *Wolffella* и *Wolffia* в этой части листеца имеется только один базальный кармашек, служащий исключительно для вегетативного размножения. Соцветие у них лишено покрывала и расположено в специальной цветковой ямке на дорсальной поверхности листеца. Проводящая система у

рясковых практически отсутствует. Корни отсутствуют (*Wolffella* и *Wolffia*) или слабо развиты и не достигают грунта (*Spirodela*, *Landoltia* и *Lemna*).

Однако, таксономический статус самих *Lemnaceae* до сих пор до конца не определен. Так, многими систематиками (Stockey R.A., 1997; Davis J.I., 1995; Rothwell G.W., 2004) *Lemnaceae* рассматривается как обособленный таксон внутри родственного семейства *Araceae*. Согласно другим классификациям (Cronquist A., 1988, Hutchinson J., 1973, Thorn R.T., 1992, Les et al., 2002, Appenroth K.J. et al., 2013, Sree K.S. et al., 2016) *Lemnaceae* присвоен статус самостоятельного семейства. Даже работы по изучению нуклеотидного полиморфизма последовательностей ядерного и цитоплазматического геномов (Les et al., 2002, Rothwell et al., 2004, Tippery et al., 2015), основанные на оценке вариабельности нескольких участков хлоропластного генома (последовательности генов *matK* и *rbcL*, интроны генов *5'trnK*, *3'trnK*, *rpl16* и спейсер *trnL-trnF*), не смогли дать однозначного ответа о положении *Lemnaceae* в систематике растений.

В работе используется представитель семейства *Lemnaceae* – вольфия бескорневая (*Wolffia arrhiza*) — крохотное растение, представляющее собой плавающие на поверхности воды зелёные шаровидные структуры размером около 1 миллиметра (Рис. 4).



Рисунок 4. Вольфия бескорневая (*Wolffia arrhiza*)

Активизация научных исследований рясковых (Zhao H. et al., 2012; Lam E. et al., 2014; Appenroth K.J. et al., 2015) обоснована главным образом их высоким потенциалом для практического применения.

1.6 Перспективы использования рясковых в биофарминге

Современный перспективный курс направленный на использование растений как биофабрик (молекулярный фарминг) ставит для исследователей новые интересные задачи. Как ранее было описано, растительный биофарминг позволяет производить в растениях важные рекомбинантные белки, такие как терапевтические антитела, фармацевтические препараты, факторы роста, ферменты и вакцины. Важную роль играют множество факторов, включая растения-хозяева, целевые гены, кассеты векторов экспрессии, методы экстракции и очистки. Виды растений, как платформа биосинтеза, являются решающим фактором в достижении высоких выходов рекомбинантного белка в растении.

За последние несколько лет появилось множество эффективных систем экспрессии на основе растений, что привело к производству более 100 рекомбинантных белков у различных видов. Для экспрессии чужеродных белков используется широкий спектр растений и различных типов растительных тканей, таких как ткани листьев и стеблей различных видов и сортов табака (*N. benthamiana*, *N. tabacum*), картофеля, семян риса, кукурузы, корнеплодов, таких как морковь, бобов, фруктов, таких как бананы, томаты и клубника, а также *Arabidopsis thaliana* и люцерны. В последнее время, в связи со значительным ростом коммерческого интереса к системам растительной экспрессии, из-за их привлекательных и уникальных характеристик, обычные водные сорняки, такие как ряска, привлекают больше внимания по сравнению с другими системами растительной экспрессии.

Рясковые как растительная платформа уже совершила прорыв в биосинтезе как сырьевое растение. Ряска используется для производства большого количества биологических продуктов с высокой ценностью (Yang G.-L., 2021). Всё это обусловлено ее преимуществами. Одно из таких преимуществ это – высокое содержание белка. Рясковые с давних времен используются человеком для кормления домашних животных. Тотальное содержание белка варьируется у разных видов до 45% от сухой массы, крахмала – от 10 до 20%, жира – от 1 до 5%, а содержание клетчатки до 25%. Белок, содержащийся в ряске, считается высококачественным вследствие его аминокислотного состава (Appenroth et al. 2017). У ряски, принадлежащей к разным родам *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* и *Wolffia*, распределение аминокислот близко к рекомендациям ВОЗ (например, 4,8% Lys, 2,7% Met + Cys и 7,7% Phe + Tyr) показало исследование, описанное в статье Appenroth с соавторами в 2017 году. Не удивительно, что, имея такой хороший белковый состав некоторые виды ряски, особенно рода *Wolffia* традиционно используются в азиатских странах в качестве дополнительной белковой пищи в рационе человека (Bhanthumnavin and McGarry, 1971; Cheng and Stomp 2009). Из вольфии готовят различные блюда, например, салаты, омлеты, овощные подливы и т. д. Содержание незаменимых аминокислот близко к стандартам Всемирной организации здравоохранения. Содержание жира довольно низкое, но доля полиненасыщенных жирных кислот превышает 60% от общего количества жира (Appenroth, K. J., 2017). Виды рода *Wolffia* не содержат оксалаты в виде оксалата кальция, которые могут вызвать проблемы со здоровьем у людей (Landolt and Kandeler, 1988; Franceschi V. R., 2005). В некоторых исследованиях была показана возможность эффективного использования ряски для кормления домашних животных (Sree K.S. et al., 2016).

Использование ряски для питания человека перспективно в коммерческих масштабах из-за ее более высокой цены по сравнению с кормом для животных. Однако требования к условиям выращивания также высоки. При оптимальных условиях выращивания необходимо отбирать клоны с самым высоким

содержанием белка. Кроме того, во всех клонах, рассматриваемых для этой цели, необходимо измерять концентрацию возможных антипитательных веществ. (Takacs K., 2025)

С помощью вольфии, благодаря апопластному обмену веществами, можно получать рекомбинантные белки без очистки из самого растения, а выделять из культивационной среды, что позволит сократить затраты и увеличит скорость производства вакцин или же терапевтических белков. Таким образом, все эти преимущества позволяют рекомендовать *Wolffia* в качестве перспективных растений продуцентов для создания вакцин.

1.7 Особенности культивирования *in vitro* растений *Wolffia arrhiza*

Для успешного получения стабильных трансформированных растений необходимо иметь высокоэффективную систему регенерации целых растений в условиях *in vitro* (Bregitzer P. et al., 1998). Как известно, регенерационная способность является свойством генотипа, зависящим от вида, сорта или даже от отдельных растений (Козырева и Дунаева, 1994; Чернобровкина М.А. и др., 2004; Magnusson and Bornmann, 1985; Klcova L. et al., 2004; Filippov M. et al., 2006). Для реализации клеткой своего морфогенетического потенциала необходимо создать определенные условия *in vitro* (Войнов и др., 2009). Наиболее сложными культурами в этом плане являются однодольные растения. (Stiff C.M. et al., 1995; Lemaux P.G. et al, 1999; Altpeter F., 2000; Oldach K.H., 2001; Chang Y. et al, 2003). Рясковые являются однодольными культурами. Поэтому их генетическая трансформация довольно сложна.

Культивирование и трансформация растений рода *Wolffia* отличается от других представителей семейства *Lemnaceae*. В случае трансформации вольфии бескорневой используют промежуточную каллусную фазу, так называемую кластерную структуру (Khvatkov P. et al, 2015) (рис. 5). Термин «кластер» используют в данном случае как наиболее подходящий для описания частично дедифференцированных пролиферирующих, как правило, округлых структур,

которые развиваются из почек или других меристематических тканей (Ziv M., 1999).

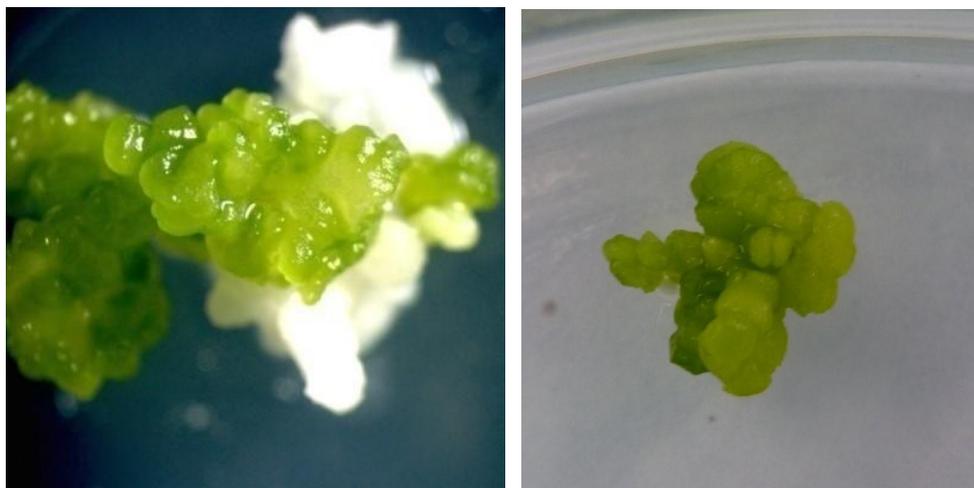


Рисунок 5. Промежуточная каллусная фаза вольфии бескорневой (кластерные структуры)

В случае трансформации вольфии бескорневой через промежуточную каллусную фазу используется следующая методика. Исходные растения ряски культивируют в чашках Петри на агаризованной среде в течение 16 недель, содержащей регуляторы роста 2,4-Д совместно с ВА до образования кластеров. В дальнейшем их используют для агробактериальной трансформации.

Агробактериальную трансформацию вольфии осуществляют путем кокультивации кластерных структур с агробактерией в течение 72 часов. Затем инокулированные кластеры переносят на агаризованную среду, содержащую селективный агент (канамицин, гигромицин) и антибиотик для элиминации агробактерии (цефотаксим или тиментин). В процессе селекции кластеры периодически пассируют на свежую среду, в результате чего происходит его пролиферация и регенерация целых растений (Mourenets L., 2002; Khvatkov P. et al, 2015).

В работе Хваткова с соавторами 2015 года описана успешная индукция кластерных структур, которая происходила при использовании среды, содержащей в качестве источника углерода комбинацию 1% сорбитола + 1% маннитола + 2% глюкозы. Данный состав среды отличается высокой степенью выровненности

кластерных структур и выходом их на уровне 97-98%. Наряду с индукцией кластеров на данной среде было отмечено образование каллуса с частотой 2-3%. Также было отмечено, что необходимо использовать среду Шенка-Хильдебрандта (SH) с добавлением 5 мг/л 2,4-D + 0,5 мг/л ВА. В статье было описано, что прекультивирование эксплантов в течение 3-4 месяцев позволяет добиться индукции стабильных каллусных структур с частотой более 95%. Однако, максимальной эффективности пролиферации каллуса удалось достичь только при прекультивировании эксплантов на первом этапе каллусогенеза в течение 3,5 месяцев. Было отмечено, что поддержание каллуса в культуре *in vitro* более года приводит к практически полной потере морфогенных потенций (с 78% до 6%, т.е. в среднем 6% в месяц). (Khvatkov P. et al., 2015).

Данные исследования, проведенные с вольфией бескорневой, были взяты за основу для дальнейшего изучения и использования ее в качестве экспрессионной платформы для наработки целевых терапевтических белков.

1.8 Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (ГКСФ)

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) — полипептидный цитокин, стимулирующий продукцию нейтрофилов из клеток предшественников. Этот цитокин способствует выживанию клеток-предшественников нейтрофильных гранулоцитов, стимулирует их деление, последующую дифференцировку и созревание, необходим и для активации зрелых нейтрофилов. ГКСФ состоит из 127 аминокислот с двумя участками гликозилирования. ГКСФ способен не только увеличивать количество нейтрофилов (гранулоциты, осуществляющие фагоцитоз патогенных микроорганизмов и продуктов распада тканей организма) но и усиливать их противоинфекционные свойства – хемотаксис и фагоцитоз. Обладая таким спектром активностей, ГКСФ широко применяется в онкологической практике и

при трансплантации костного мозга. В литературном обзоре Anke Franzke в 2006 описывается множество функций человеческого ГКСФ (Рис. 6) (Franzk A., 2006).

ГКСФ был обнаружен у многих млекопитающих: человека, мыши, свиньи, крысы, кошки, овцы, лошади. Последовательности исследованных цитокинов показали высокий уровень сходства (65-90%) (Скрышник К. А., 2004).

ГКСФ был оценен в клинических испытаниях в качестве адъюванта вакцины у ВИЧ-инфицированных пациентов. Предварительные результаты были многообещающими (Breitbach C.J., 2011).

Рекомбинантный цитокин на сегодняшний день получают в основном двумя способами – синтезом в трансгенных дрожжах (Vacchelli E., 2013) или в клетках животных (Serova I.A., 2012); первый ограничен недостаточной точностью процессинга, а второй довольно дорог. Поэтому наработка рекомбинантного ГКСФ в растениях является одной из важных стратегий получения качественного материала медицинского назначения.



Рисунок 6. Функции ГКСФ в организме человека (Franzk A., 2006 Mini review)

К сожалению, очень мало сообщений о получении рекомбинантного ГКСФ в растениях. Первая работа, посвященная экспрессии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, была опубликована в 2002 году Shin-Young Hong с соавторами. В статье была показана возможность наработки рекомбинантного ГКСФ в каллусной суспензионной культуре *Nicotiana tabacum* модифицированной методом агробактериальной трансформации. (Hong S.Y., 2002). Выход рекомбинантного ГКСФ составил 105 мг/л. В 2012 году в статье Tabar M. S. с соавторами показали, что регенеранты, полученные из трансгенной суспензионной культуры растений табака, выращиваемые в тепличных условиях имели наследование гена ГКСФ соответственно закону Менделя (3: 1). (Tabar M. S. et al, 2012). Вторая работа была опубликована теми же авторами 2013 году (Tabar M. S. et al, 2013). Корейскими учеными была показана возможность экспрессии рекомбинантного ГКСФ в суспензионной культуре риса. На рядковые подобные эксперименты не проводились.

1.9 Гирудин

Гирудин (лат. *hirudin*) — антикоагулянт, содержащийся в слюнных железах пиявок. Секрет слюнных желез пиявки содержит большое количество биологически активных веществ, в том числе группу изогирудинов – ингибиторов тромбина. Это семейство полипептидов включает три основных компонента (гирудин-1, гирудин-2 и гирудин-3) и более 17 их аналогов с различными аминокислотными заменами. Гирудин-1 является среди них самым сильным ингибитором тромбина (Clore G.M., 1987; Костромина М.А., 2012). Дисульфатогирудин-1– высокоселективный ингибитор тромбина, секретируемый слюнными железами медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*. Этот антикоагулянт прямого действия используется в качестве противотромботического средства при острой коронарной недостаточности, инфаркте миокарда, тромбозах глубоких вен нижних конечностей (Greinacher and Warkentin, 2008).

Все природные гирудины состоят из 64–66 аминокислотных остатка, обладают одинаковой пространственной организацией (N-концевой домен с тремя дисульфидными связями и кислый C-концевой домен) и содержат сульфогруппу на Tyr63. Гирудины являются бивалентными ингибиторами тромбина прямого действия, поскольку одновременно связывают два его сайта: их N-концевые области взаимодействуют с субстратсвязывающим участком активного центра тромбина, а отрицательно заряженные C-концевые домены – с анионсвязывающим экзосайтом тромбина (Fenton J.W., 1991, Mengwasser K.E., 2005). Для связывания гирудина с тромбином большое значение имеет наличие сульфогруппы на Tyr63, поэтому несульфатированные рекомбинантные аналоги обладают сниженной антикоагулянтной активностью (Stone S.R., 1986). Были созданы многочисленные модифицированные аналоги с повышенной антитромботической активностью (Костромина М. А., 2012). Среди уже зарегистрированных медицинских препаратов – рекомбинантный гирудин (дезирудин, Iprivask, Canyon Pharmaceuticals) и лепирудин (Refludan, Bayer Schering Pharma, SanofiAventis и др.), содержащий две аминокислотные замены Val1Leu и Val2Thr (Narayanan K, 1991; Greinacher A., 2004; Iqbal O., 2005). Помимо существующего рекомбинантного аналога гирудина-1 (63-десульфатогирудина-1), медицинское значение имеют его модифицированные аналоги, обладающие повышенной активностью и стабильностью. (Костромина М. А., 2012).

В настоящее время промышленное производство рекомбинантного гирудина сосредоточено на лизатах клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Niazi et al., 2015). Также используются различные экспрессионные системы на основе бактерий (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* and *Streptomyces lividans*), нитчатых грибов (*Acremonium chrysogenum*, *Ogataea angusta*), метилотрофных дрожжей (*Pichia pastoris*), в клетках трансгенных животных. (Dodt et al., 1986; Rosenfeld et al., 1996; Radzio et al., 1997; Yen et al., 2008; Hu et al., 2009; Chen et al., 2012).

Анализ литературных данных показал, что очень мало работ, посвященных наработке рекомбинантного гирудина в растительных системах. Первые работы появились в 1995-96 годах. Parmenter с соавторами (Parmenter D.L. et al., 1995) разработали экспрессионную систему на основе растений рапса масличного (*Brassica napus*), где гирудин экспрессировался в слиянии с олеозином, накопление слитого белка гирудин-олеозин достигало 1% общего белка семян (около 0,3% гирудина). Аналогичные результаты были получены при использовании эфиопской горчицы *Brassica carinata* и сафлора *Carthamus tinctorius* (Chaudhary S. et al. 1998). Основным недостатком данной системы является необходимость ферментативного расщепления слитого белка гирудин-олеозин с последующей очисткой гирудина, что ведет к значительным дополнительным затратам.

Гирудин накапливается в клетках слюнных желез пиявки и является секретлируемым белком (Bagdy D. et al., 1976). Гирудин экспрессируется в форме предшественника размером 85 аминокислот с отщепляемым N-концевым сигнальным пептидом длиной 20 а.о. (Harvey R.P. et al., 1988; Müller C. et al., 2016). Молекула зрелого гирудина стабилизирована тремя дисульфидными связями, тирозин в положении 63 сульфатирован. Гирудин является весьма стабильным пептидом, характеризуется высокой устойчивостью к повышенным значениям температуры, к воздействию денатурантов, стабильностью в широком диапазоне pH (1,47-12,9) (Chang, 1991). Кроме того, гирудин обладает свойствами ингибитора сериновых протеиназ (Chang, 1991). Эти его особенности представляют интерес изучения возможности экспрессии гирудина в растениях без белка-партнёра. Подобное исследование на растительных системах было произведено на примере *Lemna minor*. В статье Kozlov O. N. с соавторами описывали метод агробактериальной трансформации *Lemna minor* генами β -глюкоронидазы и гирудина-1. Было получено 8 трансгенных линий ряски, содержащих ген гирудина-1, при этом максимальное накопление гирудина составляло 0,02% от общего количества растворимого белка. (Kozlov O. N. et al, 2018).

Немногочисленные исследования по наработке рекомбинантного гирудина говорят о сложности его получения в растительных платформах.

1.10 Использование биореакторов для растительного биофарминга

Культивирование организмов для биотехнологических целей достаточно хорошо разработано для таких экспрессионных систем как животные (клетки яичника китайского хомяка (CHO), мышечные клетки NS0 и Sp2/0), бактериальные (*Escherichia coli*) и дрожжевые (*Saccharomyces cerevisiae*). Интенсивные исследования в области выращивания культур клеток растений начались сравнительно недавно. Суспензионные клеточные культуры на основе растений привлекают внимание исследователей как перспективные потенциальные системы для наработки фармацевтически ценных белков.

В 2006 году фирме «Dow AgroSciences» США была выдана лицензия на способ получения вакцины против возбудителя болезни Ньюкасла (псевдочума, азиатская чума кур) полученной из суспензионной клеточной культуры табака. (Yusibov V. et al, 2008). С 2007 года компания «Protalix» (Израиль) разрабатывала клеточные культуры моркови, риса и табака, которые предполагались к коммерческому использованию для наработки рекомбинантных белков, вакцин от флавивирусов, а также антител для антиаллергенной иммунной терапии. (Martinez C.A. et al. 2012; Lienard D. et al, 2007). Преимуществом суспензионных клеточных культур как системы экспрессии для наработки рекомбинантных белков является то, что клеточные культуры можно унифицировать по ростовым характеристикам, размерам и типам клеток, в отличие от целых растений. Более того, клетки выращиваются в строго контролируемых условиях, при которых скорость накопления продукта не меняется от пассажа к пассажу, что является более технологичным и экологически безопасным процессом.

Однако приведенные примеры экспрессии чужеродных генов в суспензионных культурах относятся к транзистентному способу наработки белков.

Использование транзистентных систем экспрессии лишь частично снимает экологические проблемы. Это связано с тем, что используются большие объемы агробактериальной суспензии (десятки и сотни кубометров), несущие самореплицирующиеся вирусные векторы; эта суспензия может случайно попасть в окружающую среду. Более того, при использовании систем транзистентной экспрессии остается актуальной проблема утилизации большого количества растительных отходов. Использование закрытых систем культивирования (биореакторов) позволяет полностью устранить указанные недостатки и тем самым повысить доступность целевых рекомбинантных белков для потребителей.

В настоящее время биореакторы используют не только для получения вторичных метаболитов в суспензионной культуре, а также для размножения растений путем соматического эмбриогенеза. Эта система применяется для ряда декоративных, овощных и ягодных культур таких как *Amaryllis hippeastrum*, *Araceae species*, *Coffea Arabica*, *Gladiolus grandiflorum*, *Lilium spp* и многих других (Takayama et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Akita and Takayama, 1994; Pan et al., 1995; Ziv et al., 1998; Ziv, 2005). Фитобиореакторы возможно использовать и для промышленной наработки терапевтических рекомбинантных белков из трансгенных растений.

1.11 Особенности культивирования рясковых в биореакторах

Фитобиореакторы в производстве использовались в основном для культивирования весьма мелких объектов для получения из них вторичных метаболитов или соматических эмбрионов в суспензионной культуре. Культивирование целых растений вызывает большие сложности.

В области генетической инженерии *Lemnaceae* и коммерциализации полученных результатов лидирующую позицию занимала компания «Biolex» как часть компании «Bayer». Компания использовала генетические конструкции, которые позволили секретировать белки (α -2 β -интерферона и моноклональные

антитела Fab) в апопласт. Таким образом получалось выводить рекомбинантный белок непосредственно в культуральную среду (Spenser et al., 2005; Stomp, 2005). В 2007 году компанией Biolex была разработана система по культивированию ряски в биореакторах. Данная система себя хорошо зарекомендовала, и на ее основе был запущен производственный цикл.

Культивирование ряски осуществляют в маленьких бассейнах глубиной до 15 см. Среднесуточный прирост зеленой массы вольфии под открытым небом за период с мая по октябрь составляет около 0,2 кг/м², или 60 т/га сырой массы в месяц. Из-за биологических особенностей вольфии бескорневой возможно ее глубинное культивирование в биореакторах, что позволяет более рационально использовать культивационную площадь.

В работе Хваткова с соавторами 2013 года был подробно описан режим глубинного культивирования вольфии бескорневой в биореакторе (Хватков П.А. и др., 2013). Было показано, что предпочтительна гидродинамическая схема ферментации, а эффективность данной системы по наработке биомассы популяции в 2 раза выше по сравнению с механической схемой. Культивирование вольфии в модифицированном гидродинамическом биореакторе «Biostat PBR 2S» при использовании среды W3M и соблюдение специальных параметров (температура 27-29 °С, рН 5,7-6,0 фотопериод 24/0) позволило получить наибольшую продуктивность прироста биомассы популяции. Данные результаты были взяты за основу для проведения дальнейших исследований.

1.12 Заключение по обзору литературных источников

За последние годы в мире существенно возрос спрос на рекомбинантные белки. Особенно популярна область биотехнологии, связанная с биофармингом (использование растений в качестве платформы для наработки различных рекомбинантных белков). Растительные платформы привлекательны для исследований и производства, поскольку имеют ряд плюсов – в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка вирусами и прионами

(инфекционными белками) животных, высокое качество продукции, возможность использования круглогодичных закрытых производственных систем (использование теплиц или ферментеров). Растительные платформы подходят для производства экстренных вакцин и диагностических средств, например, в качестве контрмер против новых штаммов вируса гриппа и SARS-CoV-2, которые необходимы к получению в течение нескольких недель или месяцев после подтверждения генетической последовательности вируса (Capell et al., 2020; Rosales-Mendoza et al., 2020). Растительные системы не лишены недостатков, например, часто низкий уровень экспрессии перенесенных генов или же протеолиз чужеродных белков в цитоплазме растительной клетки способны снижать рентабельность производства вакцин. Также серьезным препятствием для внедрения растительного биофарминга является неотработанный механизм интеллектуальной собственности и нормативно-правовой базы по сравнению с промышленными системами экспрессии клеток микробов и млекопитающих. Тем не менее растительные платформы остаются по-прежнему привлекательными для исследований. Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. Перспективной растительной платформой могут стать растения подсемейства *Lemmaeae*. Некоторые особенности рясковых, такие как высокая скорость прироста биомассы, высокое содержание белка в тканях, малый размер, позволяет считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков. Одна из важных особенностей растений рода *Wolffia* заключается в том, что в отличие от других представителей подсемейства *Lemmaeae* у них нет корневой системы. Это позволяет культивировать их глубинным способом в биореакторах в полностью контролируемых условиях, что может значительно повысить рентабельность производства рекомбинантных белков.

Ежегодное проведение международного форума ICDRA включающего секцию по рясковым (7th ICDRA 2024) показывает перспективность развития

данной области исследований. Одно из интересных исследований, представленных на форуме было исследование нового эндогенного сильного промотора в ряске *LpSUT2*, также был исследован его основной молекулярный механизм (Wei, C., 2024). Что касается создания трансгенных растений рясковых, то за последние годы сообщество не сильно в этом преуспело, поскольку создание трансгенных растений затруднено из-за их сложности и длительности процесса получения.

В настоящее время существует проблема получения некоторых важных терапевтических белков, например, гирудина. Гирудин – секреторный белок слюнных желез пиявки, ингибитор тромбина. Используется в качестве противотромботического средства при острой коронарной недостаточности, инфаркте миокарда, тромбозах глубоких вен нижних конечностей (Greinacher and Warkentin, 2008). Сообщений о наработке гирудина в растительных системах очень мало из-за сложной очистки его из растительных тканей. Данный антикоагулянт нарабатывается в лизатах клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, некоторых бактериальных системах, нитчатых грибах, также в трансгенных клетках животных, но эти исследования еще не получили дальнейшего развития из-за низкой активности рекомбинантного гирудина, а также небольшого выхода белка. В растительных системах реальных разработок по наработке гирудина и его модифицированных аналогов нет. ГКСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека) является полипептидным цитокином, стимулирующим продукцию нейтрофилов, применяется в онкологической практике и при трансплантации костного мозга. Нароботка рекомбинантного ГКСФ производится в настоящее время в дрожжевых и животных системах. Сообщений о работе и получении данного белка в растительных системах очень мало и в основном только на модельных объектах (табак и другие). Анализ литературных источников показал, что растения рода *Wolffia* могут стать многообещающей экспрессионной платформой для наработки терапевтических рекомбинантных белков.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и методы

2.1.1 Объекты исследования

Объектом исследования являлись растения вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza*), принадлежащей к семейству рясковых (*Lemnaceae*). В исследованиях использовались цельные одиночные растения вольфии, культивируемые на агаризованной среде Шенка-Хильдебрандта при 21°C, 65 $\mu\text{моль} / \text{м}^2$ сек интенсивности освещенности при 16 ч фотопериоде, которые в дальнейшем проходили период прекультивации 4 месяца на среде SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), содержащей 1% манитола, 1% сорбитола, 2% глюкозы в качестве источников углерода и 5 мг/л 2,4-D совместно с 0,5 мг/л ВА (Khvatkov P. et al, 2015).

2.1.2 Подготовка и приготовление сред

В работе использовали питательные среды доведенные до соответствующего значения pH с помощью 2N KOH, далее среды стерилизовали автоклавированием при давлении в 1,9 атмосфер и температуре 121°C в течение 20 мин. Регуляторы роста и витамины стерилизовали холодным фильтрованием (фильтры Millipore, 0,22 мкм) и добавляли в остывшую до 50-60°C среду после автоклавирования.

2.2 Молекулярно-генетический анализ трансгенных образцов вольфии

2.2.1. Гистохимический анализ активности гена *uidA*

Гистохимическое окрашивание на предмет экспрессии гена *uidA* проводили согласно методу Jefferson et al. (1987). Как контрольные, так и предположительно трансгенные экспланты подвергали вакуумной инфльтрации 0,1% X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкуроновой кислоты натриевой соли, Thermo

Scientific, Литва) буфера, содержащего 100 мМ NaPO₄-буфера (0,2 М NaH₂PO₄ x 2H₂O; 0,2 М Na₂HPO₄; pH 7,0), 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУ), 0,1% Тритон X-100 и 10 мМ KFe(CN)₆-буфера (0,1 М K₃[Fe(CN)₆]; 0,1 М K₄Fe(CN)₆ x 3H₂O) и инкубировали в темноте в течение 18 ч при 37 °С. Далее растения отмывали в 80%-ном растворе этанола. После, растения подвергались визуальной оценке на предмет окрашивания тканей, а также производился расчет эффективности трансформации.

2.2.2 Выделение тотальной растительной ДНК

Из регенерантов прошедших отбор на селективной среде, выделяли ДНК по методу Эдвардса (в модификации) для дальнейшей идентификации вставки гетерологичного гена методом ПЦР-анализа. Геномная ДНК выделялась соответственно стандартной методике без изменений.

2.2.3 ПЦР-анализ трансгенных растений

Наличие последовательности гетерологичных генов в тотальной ДНК образцов вольфии проводили с помощью ПЦР-анализа. При проведении ПЦР на наличие вставки целевых и селективных генов использовали следующие пары праймеров:

ген *hpt* *hptf*: 5'-ACATTGTTGGAGCCGAAATC-3' и *hptr*: 5'-
 GACATTGGGGAGTTTAGCGA-3'; ген *Hirudin* HirXF: 5'-
 AGCTCTAGAATGGCCAAGAGGATTGC-3' и HirSR: 5'-
 TTCGAGCTCTCATTGGAGGTA CTCTTCAGG-3'; ген *GCSF* Gfr1for: 5'-
 GTCCTCTAGAATGGCGAAGAGGATCGCC-3' и Gfr2rev: 5'-
 ATGAGCTCTCACGGTTGGGCGAGATG-3'; для *virC* были *virC1*: 5' -
 GCACTATCTACCTACCGCTACGTCATC-3' и *virC2*: 5' -
 GTTGTCGATCGGGACTGTAAATGTG-3'. (95°С- 5 мин (горячий
 старт - денатурация), (93°С-45 сек (денатурация), 60°С-1 мин (отжиг), 72°С-45
 сек (элонгация))X35, 72°С-5 мин).

Объем ПЦР смеси составлял 25 мкл, конечная концентрация dNTP-0,5mM, конечная концентрация праймеров – 0,4 пкмоль/мкл, количество Taq-полимеразы на реакцию 2,5 ед., также смесь содержала 1X реакционный буфер. При проведении ПЦР применяли амплификатор MJMini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad).

2.2.4 Визуализация продуктов ПЦР

Визуализацию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,2% агарозном геле в электрофорезной камере фирмы «Bio-Rad» (США). Визуализацию ДНК проводили с помощью трансиллюминатора и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

2.2.5 Саузерн-блот анализ образцов содержащих целевые белки

Для саузерн-блот анализа для выявления последовательности целевого гена ГКСФ использовали геномную ДНК трансформированных и нетрансформированных растений *Wolffia* (навеска весом 50 мкг). ДНК расщепляли при помощи эндонуклеазы рестрикции *Hind*III (100 единиц) которая разрезает Т-ДНК рCamGCSF (рис.8) в одном положении в течение 16 часов при 37 °С. Далее производился электрофорез в агарозном геле (0,8%). Продукты рестрикции были иммобилизованы на мембране Hybond + (Amersham, США) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК-зонд был синтезирован на матрице плазмиды рCamGCSF методом ПЦР с парой праймеров G1for и G1rev. Зонд (600 п.н.) метили щелочной фосфатазой с помощью набора AlkPhos Direct Labeling Kit (Amersham Bioscience, США). Сигналы на мембране детектировались с помощью реагента CDP Star в соответствии с инструкциями производителя (Amersham, Bioscience).

Саузерн-блот-анализ на предмет наличия искомой последовательности гирудина проводили на матрице геномной ДНК (40 мкг) трансгенных растений и растений *Wolffia* дикого типа. ДНК расщепляли эндонуклеазой рестрикции *XbaI* (100 ед.), которая разрезает Т-ДНК *pCamHIR* (рис. 9) в одном положении при 37°C в течение 16 ч. Проводили электрофорез в агарозном геле (0,8%), продукты рестрикции иммобилизовали на мембране Hybond+ (Amersham, США) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК-зонд был синтезирован на плазмидной матрице *pCamHIR* методом ПЦР с парой праймеров *HirXF* и *HirSR*. Зонд (294 п.н.) метили щелочной фосфатазой с использованием набора *AlkPhos Direct Labeling Kit* (Amersham Bioscience, США). Сигналы на мембране детектировали с помощью реагента *CDP Star* согласно инструкции производителя (Amersham Bioscience). Сигнал с мембраны накапливали на рентгеновских пленках (*XBE blue* чувствительный, *Retina*) в пленочной кассете при комнатной температуре (КТ) в течение 24 часов. Рентгеновские снимки сканировали на приборе *Epson Perfection V750 PRO* (EPSON).

2.3 Количественный анализ содержания белка

2.3.1 Выделение тотального водорастворимого белка

1. Гомогенизацию растительной ткани проводили в пробирке объемом 1,5 мл с помощью пестика-гомогенизатора. Навеска составляла 30 мг на каждый образец.
2. Растертую ткань ресуспендировали в 250 мкл фосфатного буфера; pH 9,0 (18 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8 мМ K_2HPO_4).
3. Смесь инкубировали 5 мин на водяной бане при 80 °С.
4. Смесь центрифугировали 10 мин при $18,0 \times 10^3 \text{g}$ и 21 °С. Супернатант объемом 150 мкл переносили в новую микропробирку.

5. Отбирали супернатант, добавляли к нему 1350 мкл 96% этанола и обрабатывали на вортексе.
6. Смесь оставляли при +4°C на сутки.
7. Смесь центрифугировали 10 мин при $16,1 \times 10^3 g$.
8. Отбирали супернатант, осадок высушивали в течение часа при +30°C.
9. Полученный осадок растворяли в 300 мкл. 0,1 N NaOH.

2.3.2 Проведение вестерн-блот анализа

Проведение вестер-блот анализа для растений содержащих интеграцию гена ГКСФ. В жидком азоте измельчали трансгенные и нетрансформированные растения вольфии, навеска составляла 1 г. Далее ресуспендировали в трёхкратном объёме экстракционного буфера (50 mM Трис-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 5 mM β -меркаптоэтанола, 0,62 мкМ аprotинина, 8,4 мкМ лейпептина). Экстракцию проводили в течение 40 мин при 4°C с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 16 000 g; супернатант собирали для последующего анализа. Концентрацию белка в образцах определяли методом Брэдфорда (Bradford, 1976).

Электрофорез белков (70 мкг белка/дорожка) проводили в 10–25% градиентном ПААГ-электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США). Использовали кроличьи поликлональные антитела к hG-CSF (разведение 1:1000; Abcam, Великобритания) и антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой (1:3000; Pierce, США). Положительным контролем служил рекомбинантный hG-CSF (Abcam, Великобритания). Блоты визуализировали с помощью хромогенного субстрата BCIP/NBT (Fermentas, Литва).

Проведение вестер-блот анализа для растений содержащих интеграцию гена гирудина. В жидком азоте измельчали трансгенные и нетрансформированные растения вольфии, навеска составляла 1 г. Далее ресуспендировали в 3 мл следующего буфера для экстракции: 50 мМ Трис-НСl, рН 7,6; 150 мМ NaCl; 5 мМ ЭДТА; 5 мМ 2-меркаптоэтанол; аprotинин (4 мг/л) и лейпептин (4 мг/л). Затем материал экстрагировали в течение 20 мин при 4 °С и центрифугировали при 12 000 g, после чего супернатант собирали и использовали для дальнейших анализов. Концентрацию белка определяли методом Лоури (1951) с использованием DC Protein Assay (BioRad, США), препараты хранили при температуре -70 °С. Образцы белка последовательно разбавляли в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) и загружали в 96-луночный планшет для ИФА [0,5, 1,0 и 2,0 мкг общего растворимого белка (TSP) на лунку], используя гирудин (Abcam, Великобритания) в качестве стандарта сравнения.

Электрофоретическое разделение белков проводили в 10–22% градиентном SDS-PAGE по методу Лэммли (Laemmli, 1970); в каждую лунку вносили 70 мкг белка. В качестве положительного контроля использовали рекомбинантный гирудин (AbCam, Великобритания). Для переноса белков в жидкий буфер использовали ячейку Mini Trans-Blot® Cell (BioRad, США) с использованием буфера для переноса Towbin (1979). После переноса белка мембраны блокировали в 4% обезжиренном молоке (BioRad, США) на буфере PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, гибридизацию с первичными антителами проводили в течение 16 ч при 4 °С. Для детекции гирудина использовали мышинные моноклональные антитела в разведении 1:1000 (AbCam, Великобритания), а в качестве вторичных антител – антимышинные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (BioRad, США), в разведении 1:2000. Гибридизацию со вторичными антителами проводили в течение 1 ч. Изображения на мембранах получали с использованием хромогенного субстрата BCIP/BT (Fermentas, Литва) и визуализировали с помощью системы Amersham Imager 600RGB (GE, США).

2.3.3 ИФА (ELISA) Количественная оценка накопления гирудина и ГКСФ

Оценка накопления целевых белков в среде проводилась методом ИФА.

Образцы белка разводили в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) и загружали в 96-луночный планшет для ИФА [0,25; 0,5; 1,0; 2,0 мкг общего растворимого белка (TSP) на лунку], используя гирудин (Abcam, Великобритания) или рекомбинантный hG-CSF (Abcam, Великобритания) в качестве контроля. Сорбцию вели в PBS, содержащем 0,05% Tween 20 и 2% бычий сывороточный альбумин (1 час при комнатной температуре).

В качестве первичных антител для гирудина использовали мышинные моноклональные антитела к гирудину в разведении 1:500 (AbCam, Великобритания), а в качестве вторичных - конъюгированные с пероксидазой хрена мышинные антитела IgG (BioRad, США) в разведении 1:2000.

Для ГКСФ использовали кроличьи поликлональные антитела против hG-CSF (Abcam, Великобритания) разводили в соотношении 1:1000, а в качестве вторичных - конъюгированные с щелочной фосфатазой кроличьи антитела IgG, (Pierce, США) в соотношении 1:2000.

Гибридизацию с первичными антителами в обоих случаях проводили в течение 16 ч при температуре +4°C. После отмывки, добавляли вторичные антитела, проводили гибридизацию со вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей отмывкой и детектированием связанных антител. Планшеты проявляли в течение 30 мин при комнатной температуре с использованием субстрата TMB Peroxidase EIA (BioRad). Планшеты считывали при 405 нм, и количество экспрессируемого растениями гирудина оценивали на основе эталонных стандартов.

2.4 Агробактериальная трансформация

2.4.1 Методика проведения транзientной агробактериальной трансформации

Для проведения экспериментов по оптимизации генетической трансформации вольфии использовали три супервирулентных штамма *Agrobacterium tumefaciens*: EHA105 (Hood E.E., 1993), CBE21 (Bagyan I.L., 1995) и AGL0 (Lazo G.R., 1991) – содержащие конструкцию pVec035, в состав которой входит интронсодержащий ген β -глюкононидазы *E. coli* (*uidA*) (рис.7)

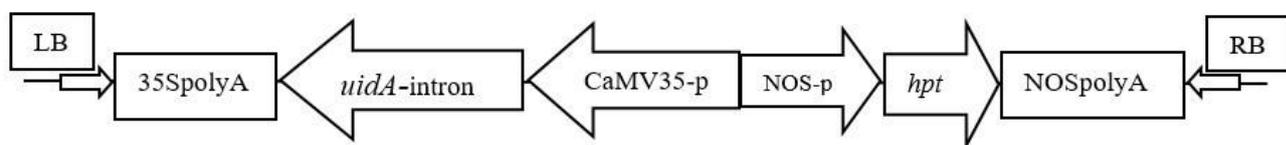


Рисунок 7. Схематическое представление области Т-ДНК вектора pVec035. CaMV35-p – промотор 35S субъединицы вируса мозаики цветной капусты; *uidA*-intron – интрон-содержащий ген β -глюкононидазы (*uidA*); NOSpolyA – терминатор нопалинсинтазы; *hpt* – белок-кодирующая последовательность гена гигромицинфосфотрансферазы; NOS-p – промотор нопалинсинтазы; 35SpolyA – терминатор 35S вируса мозаики цветной капусты с сигналом полиаденилирования; LB, RB – соответственно левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК.

Всего в экспериментах по транзientной трансформации было задействовано порядка 3750 эксплантов. Для трансформации использовали ночную культуру каждого штамма агробактерии, выращенную в шейкере-инкубаторе (180 об/мин) в течение 24 ч при 28°C в темноте в 50 мл жидкой среды YEP, дополненной соответствующими селективными антибиотиками: 100 мг/л канамицина (Km) для всех штаммов, совместно с 5 мг/л гигромицина (Hug) для штамма CBE21 или 50 мг/л рифампицина (Rif) для штаммов EHA105 и AGL0. Для инокуляции эксплантов использовали агробактериальные суспензии, разведенные стерильной дистиллированной водой до оптической плотности (OD_{600}) в

диапазоне 0,2–1,0 с шагом 0,2 единицы (т.е. 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0). В колбу объемом 250 мл помещали 20 г растительного материала и добавляли 150 мл бактериальной суспензии. Экспланты выдерживали в течение 30 мин на орбитальном шейкере (90 об/мин) и помещали для кокультивации на чашки Петри с безгормональной средой SH и размещенными на поверхности среды бумажными фильтрами. Кокультивацию эксплантов проводили на свету при 21°C. Пробы для гистохимического анализа отбирали каждые сутки (в трехкратных повторах для каждого варианта эксперимента) в течение последующих 6 суток кокультивации (24, 48, 72, 96, 120, 148 ч).

Эффективность трансформации (E) рассчитывали как частное от деления числа точек транзистной экспрессии (Ne) на общее число эксплантов в варианте (No), результат выражали в процентах (%): $E = (Ne/No) \times 100$.

2.4.2 Методика проведения стабильной агробактериальной трансформации вольфии

Эксперименты проводили методом кокультивации эксплантов (кластеров) с суспензией агробактерии. Ночную культуру агробактерии наращивали в 50 мл жидкой среды YEB, дополненной канамицином (Km) 100 мг/л и рифампицином (Rif) 50 мг/л на орбитальном шейкере (180 об/мин) в течение 24 часов при 28°C в темноте. Затем ее разбавляли стерильной дистиллированной водой, не содержащей фитогормонов, до финальной концентрации, соответствующей оптической плотности $OD_{600} = 0,4-0,6$.

В экспериментах использовались кластерные структуры вольфии, прошедшие прекультивацию. Для инокуляции 200 г растительного материала помещали в колбу общим объемом 1 л с 500 мл инокулюма и выдерживали его в течение 30 мин на орбитальном шейкере (100 об/мин). Подсушенные в потоке воздуха ламинар-бокса экспланты переносили на бумажные фильтры, помещенные на поверхность среды SH в чашках Петри, и кокультивировали на

свету при температуре 21°C в течение 72 ч. По истечении периода кокультивации экспланты отмывали жидкой безорганической средой SH с добавлением 300 мг/л тиментина и переносили на среды для культивирования эксплантов и элиминации агробактерии (100 мг/л тиментина). Для отбора трансгенного материала в состав питательной среды вводили селективный антибиотик гигромицин в концентрации 5 мг/л.

Для увеличения пролиферации тканей вольфии были использованы регуляторы роста 2,4-D совместно с ВА. В течение первых 2 недель культивирования протрансформированных эксплантов осуществлялось в присутствии в среде 2,4-D совместно с ВА. По истечении времени экспонирования на средах, содержащих регуляторы роста экспланты переносили на безгормональную среду SH для индукции регенерации. В экспериментах было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4-D и ВА (2,4-D в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л совместно с ВА в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трех повторах. Итого, было задействовано около 1600 эксплантов с использованием 65 чашек Петри в каждом повторе.

2.4.3 Агробактериальный штамм и бинарные вектора

Для проведения экспериментов по генетической трансформации вольфии применяли обезоруженный супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105 с интродукцией векторных конструкций pCamHIR и pCamGCSF (рисунок 8,9), содержащих в себе целевые гены, кодирующие дисульфатогирудин-1 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека.

Выращивание агробактерии проводили при 28 °С на агаризованной среде LB (Sambrook J. et. al, 1989), дополненной соответствующими селективными антибиотиками (100 мг/л канамицина и 50 мг/л рифампицина).

2.4.4 Векторные конструкции с целевыми белками гирудина и ГКСФ

Конструкции для агробактериальной трансформации вольфии бескорневой были получены от другой группы исследователей нашей лаборатории. При создании конструкций руководствовались следующим принципом – поскольку в нашей лаборатории уже исследовался другой представитель семейства *Lemnaceae* – *Lemna minor* L. было предположение о том, что кодонные последовательности *Lemna gibba*, принадлежащей тому же семейству *Lemnaceae*, что и *W. arrhiza*, существенно у двух этих видов не различаются. Таким образом была произведена кодон-оптимизация целевых генов относительно частоты использования кодонов у *Lemna gibba*.

Векторная конструкция для ГКСФ соответствует препарату Филграстим (Vacchelli, E., 2013) (рис. 8). Для транспорта рекомбинантных белков (ГКСФ и дисульфатогирудина-1) в ЭПР и далее в апопласт, N-концевой сигнальный пептид hG-CSF был заменён на соответствующий сигнальный пептид α -амилазы риса (GenBank: AAA33897.1). Данная конструкция была привнесена в агробактериальный штамм *A. tumefaciens* ЕНА105 и использована для трансформации вольфии (Khvatkov P.A. et al., 2018).

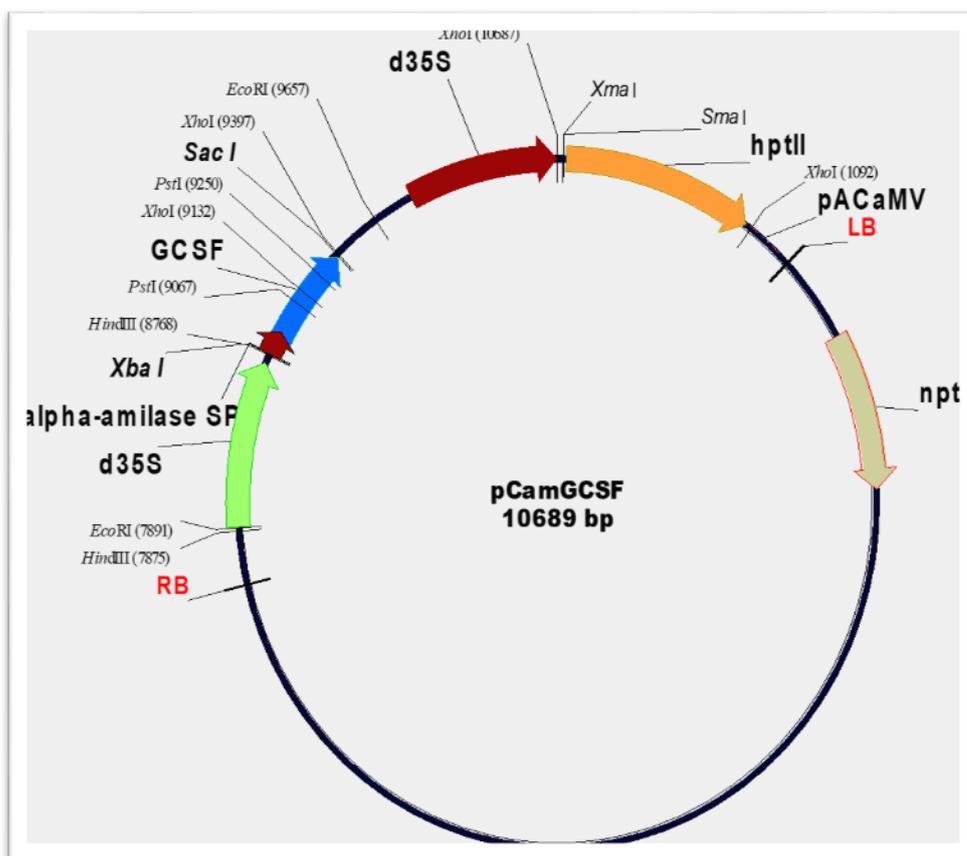


Рисунок 8. Карта бинарного вектора pCamGCSF, где LB, RB – левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК соответственно; GCSF – нуклеотидная последовательность гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора; CAMV35S- 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; D35S- двойной 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; alpha-amylase SP- сигнальный пептид альфа-амилазы риса; *hptII*-гигромицинофосфотрансфераза II; *npt* – неомицинофосфотрансфераза; pACaMV- сигнал полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты.

Векторная конструкция для гирудина. Используемая в работе плазмида pCamHIR для трансформации вольфии создана аналогично как в статье другой исследовательской группы нашей лаборатории Kozlov с соавторами (Kozlov O.N. et al., 2018) (рис. 9).

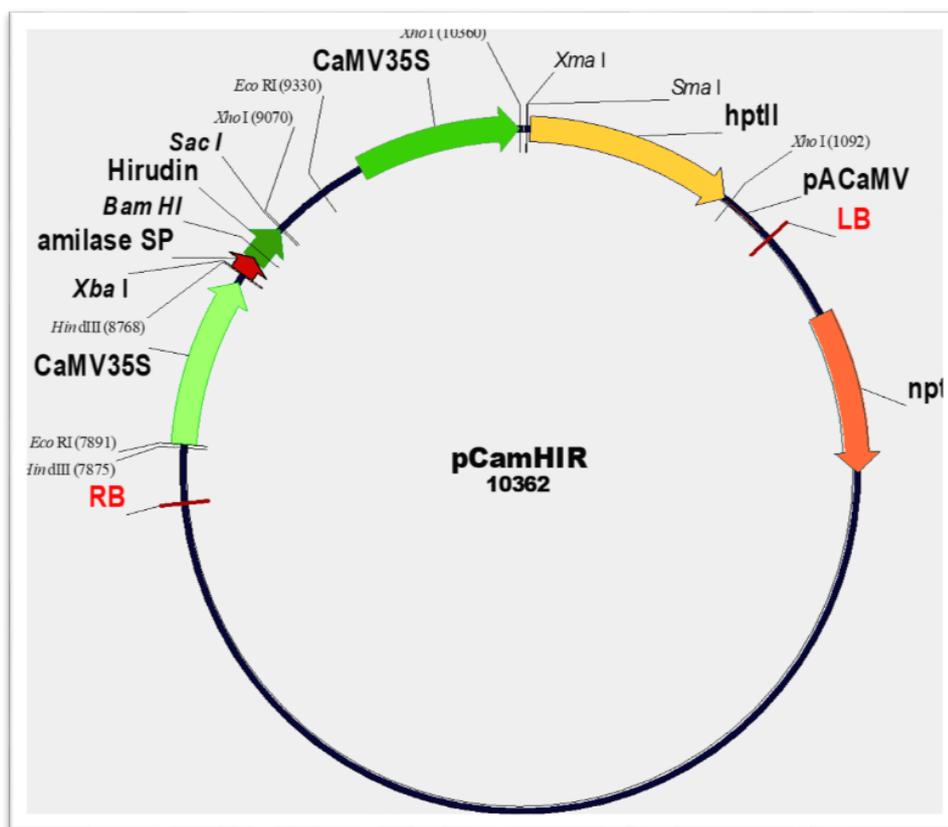


Рисунок 9. Карта бинарного вектора pCamHIR, где LB, RB – левая и правая фланкирующие последовательности T-ДНК соответственно; Hirudin – нуклеотидная последовательность гена дисульфатогирудина-1; CaMV35S- 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; D35S- двойной 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; alpha-amilase SP- сигнальный пептид альфа-амилазы риса; *hptII*- гигромицинофосфотрансфераза II; *nptII* – неомицинофосфотрансфераза; pCaMV- сигнал полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты.

2.4.5 Получение трансгенных линий (популяций) вольфии с целевыми генами

Экспериментально показано, что для получения трансгенных растений вольфии бескорневой необходима культивация эксплантов в течение первых двух недель на среде SH содержащей 2,4-D в концентрации 2,5 мг/л совместно с BA в концентрации 1,5 мг/л. Далее производился пассаж на среду SH с добавлением гигромицина в концентрации 5 мг/л и без добавления регуляторов роста. После 6 недель культивирования на среде SH без регуляторов роста на поверхности кластера появлялась зеленая меристематическая область, а из нее через 8-10

недель развивались изумрудно-зеленые глобулярные структуры, из которых затем развивались целые растения. При дальнейшем культивировании гигромицинустойчивые и нетрансформированные растения *Wolffia* не различались ни морфологически, ни по скорости роста биомассы популяции.

Получение растений с конструкцией pCamGCSF. Для агробактериальной трансформации *W. arrhiza* использовали агробактериальный штамм EHA105. Всего в экспериментах по трансформации было задействовано 8100 эксплантов.

Получение растений с конструкцией pCamHIR. В экспериментах по агробактериальной трансформации вольфии штаммом EHA105 содержащим плазмиду pCamHIR было задействовано 8550 эксплантов.

Далее все полученные трансгенные популяции вольфии были дополнительно проанализированы с помощью ПЦР, ИФА (ELISA), саузерн-блоттинга и несколько линий - с помощью вестерн-блоттинга.

2.5 Расчет эффективности стабильной трансформации

Эффективность трансформации рассчитывали, как частное от деления количества эксплантов сформировавших трансгенные популяции на общее количество эксплантов участвовавших в эксперименте, результат выражали в процентах. Все растения, которые сформировались на одной чашке Петри, принимались за одну трансгенную популяцию. Для подтверждения, что полученная гигромицинустойчивая популяция представлена одной клоновой линией, из каждой популяции случайным образом отбирали 5 единичных растений, которые в дальнейшем формировали изолированные самостоятельные популяции в присутствии селективного антибиотика в культивационной среде. Далее через 4 недели для анализов из пяти изолятов отбирался один, сформировавший наибольшую биомассу.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением частных средних и оценки

их по критерию Дункана (Доспехов, 1979; Рокицкий, 1973; <https://www.statisticshowto.com/duncans-multiple-range-test/>) с использованием программы AGROS (разработчик д.б.н. Мартынов С.П.) (Мартынов С.П., 1999).

2.6.1 Сравнение нескольких средних по критерию Дункана

При сравнении нескольких средних можно проводить сравнение попарно. Однако для использования при сравнении полной информации о всех средних такое сравнение проводят при помощи множественного рангового критерия Дункана.

Процедура состоит из серии попарных сравнений между средними значениями. Установив при помощи дисперсионного анализа значимость влияния данного фактора, выясняют при помощи рангового критерия Дункана, какие именно средние значения различны.

С математической точки зрения задача формулируется следующим образом. Имеется несколько средних \bar{x}_j , полученных по k подвыборкам объемом n_j . Требуется выяснить, являются ли числа \bar{x}_j оценками одной и той же генеральной средней. Этой формулировке соответствует нулевая гипотеза

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k, \quad (2.8)$$

где μ_1, \dots, μ_k – генеральные средние подвыборок. Каждое сравнение выполняется на уровне значимости, определяемом количеством средних, разделяющих два сравниваемых средних (для разделяющих средних). Тесты выполняются последовательно, где результат теста определяет, какой тест выполняется следующим. Далее выборки ранжируются. Данные группируются на кластеры. Кластеры нам показывают сродство вариантов выборок. В нашем исследовании кластеры показывают наиболее подходящий вариант использования гормонов из 25 вариантов комбинаций.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оптимизация условий транзientной трансформации

Для более эффективной оценки растений вольфии в качестве экспрессионной платформы для биофарминга недостаточно ограничиваться исследованиями ее потенциала каллусогенеза и регенерации, также необходимо проводить исследования и по другим критериям. Перед тем как говорить о возможности эффективной стабильной трансформации необходимо выяснить потенциал транзientной трансформации. Таким образом удастся оценить различные подходящие штаммы, имеющиеся у нас в доступе, период кокультивации агробактерии с растениями, и еще один значимый фактор – концентрация инокулюма. Эффективность транзientной трансформации выражалась в процентном соотношении от числа точек транзientной экспрессии к общему числу эксплантов в варианте. Все эти данные позволят подобрать наилучший вариант для дальнейших исследований и получения стабильных трансгенных растений вольфии.

В лаборатории, где выполнялась диссертационная работа, в доступе было 3 супервирулентных агробактериальных штамма которые и были использованы в эксперименте это: ЕНА105, СВЕ21, АGL0. Для инокуляции эксплантов использовали агробактериальные суспензии, разведенные стерильной дистиллированной водой до оптической плотности при длине волны 600 нм (OD_{600}) в диапазоне от 0,2 до 1,0 с шагом 0,2 единицы (т. е. 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0).

Результаты оказались следующие:

1. После инокуляции эксплантов суспензией агробактериального штамма ЕНА105 с оптической плотностью 0,4 (OD_{600}) через 72 ч кокультивации эффективность транзientной экспрессии была максимальной на уровне 19% (рис. 10). Во всех других вариантах наблюдалась низкая

эффективность трансформации, поэтому данный вариант был отобран для сравнения с другими штаммами.

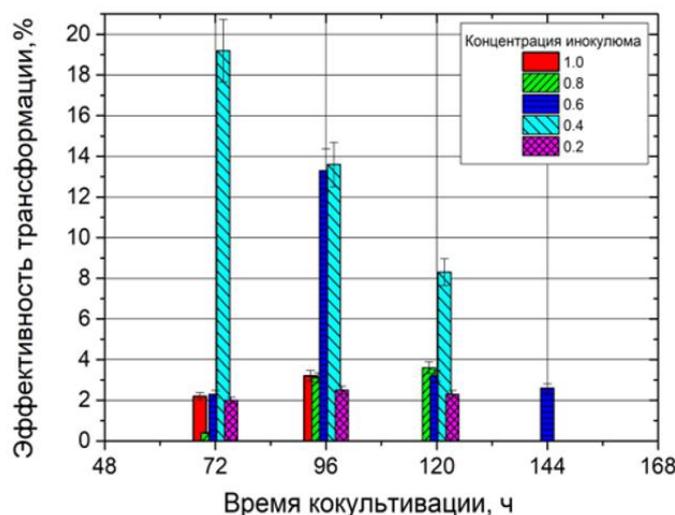


Рисунок 10. Эффективность транзientной экспрессии гена *uidA* в тканях эксплантов вольфии с агробактериальным штаммом EHA105

2. Наибольшая эффективность транзientной экспрессии в варианте с использованием штамма CBE21 была отмечена при использовании инокулюма с оптической плотностью 0,8 (OD_{600}) через 4 суток кокультивации. В этом варианте эффективность трансформации составила 14% (рис. 11).

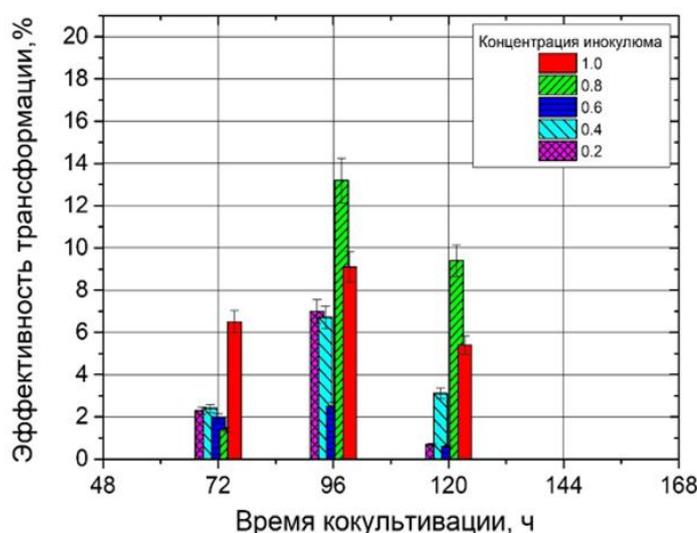


Рисунок 11. Эффективность транзientной экспрессии гена *uidA* в тканях эксплантов вольфии с агробактериальным штаммом CBE21

3. При трансформации агробактериальным штаммом AGL0 только на 5 сутки можно было отметить точки окрашивания растений, максимальная эффективность составила всего 3% в концентрации (OD₆₀₀) инокулюма 1,0 (рис.12).

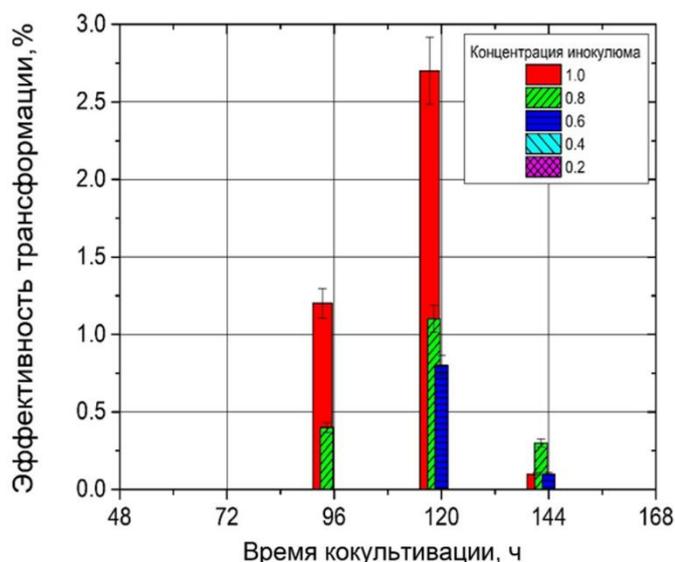


Рисунок 12. Эффективность транзientной экспрессии гена *uidA* в тканях эксплантов вольфии в зависимости с агробактериальным штаммом AGL0.

После проведения данного эксперимента было выяснено, что для достижения результата кокультивация кластеров вольфии со штаммами СВЕ21 и AGL0 в ходе эксперимента занимала больше времени от 96 до 120 часов, при оптической плотности 0,8 и 1 соответственно, а эффективность транзientной трансформации при этом была ниже (14 и 3%), чем в варианте использования штамма ЕНА105. Основываясь на полученных результатах, было решено использовать штамм ЕНА 105 в концентрации инокулюма (OD₆₀₀) 0,4, а предпочтительное время кокультивирования эксплантов с агробактерией для дальнейших экспериментов должно составлять 72 часа.

Подводя итог данного эксперимента можно подчеркнуть, что было проведено детальное исследование транзientной трансформации растений

вольфии. Пример визуальной оценки приведен на рисунке 13. Это стало первым важным шагом для понимания с каким агробактериальным штаммом стоит работать, а также в какой концентрации и какое время должна занимать последующая трансформация необходимая для получения стабильных трансгенных растений.

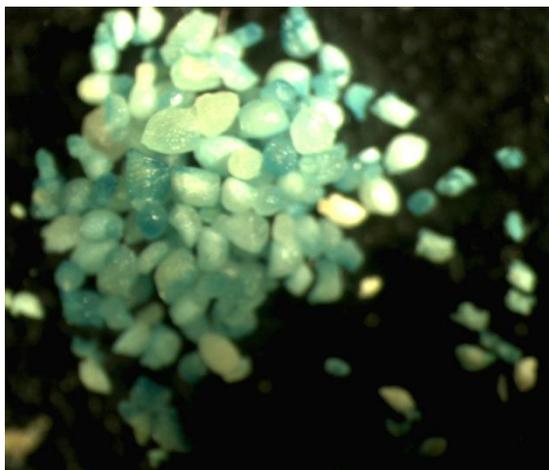


Рисунок 13. Гистохимическое окрашивание *Wolffia arrhiza* на предмет экспрессии гена *uidA* по методу Jefferson

Результаты экспериментов по оптимизации факторов, влияющих на агробактериальную трансформацию *Wolffia arrhiza* были опубликованы в журнале Applied Biochemistry and Microbiology в 2023 году. (Shvedova A., 2023)

3.2 Получение трансгенных регенерантов вольфии

Вольфия бескорневая очень быстро размножается *in vitro* вегетативным способом. В предыдущих исследованиях подробно описаны условия индукции кластерных структур, процесса каллусогенеза, а также процесса регенерации растений. (Khvatkov P. et al., 2015, 2018). На рисунке 14 приведено схематичное изображение получения цельных трансгенных растений после агробактериальной трансформации.

Первый шаг – культивирование целых растений на среде SH в течение 16 недель для получения кластерных структур. В случае вольфии под кластером

понимается частично деформированные и дедифференцированные дочерние растения, находящиеся в латеральном кармане растения, при этом сохраняющие аппарат вегетативного размножения (Khvatkov P.A., 2015).

Второй шаг – агробактериальная трансформация. Третий – регенерация и получение целых трансгенных растений в течение последующих 2 месяцев. Четвертый – размножение получившихся растений.

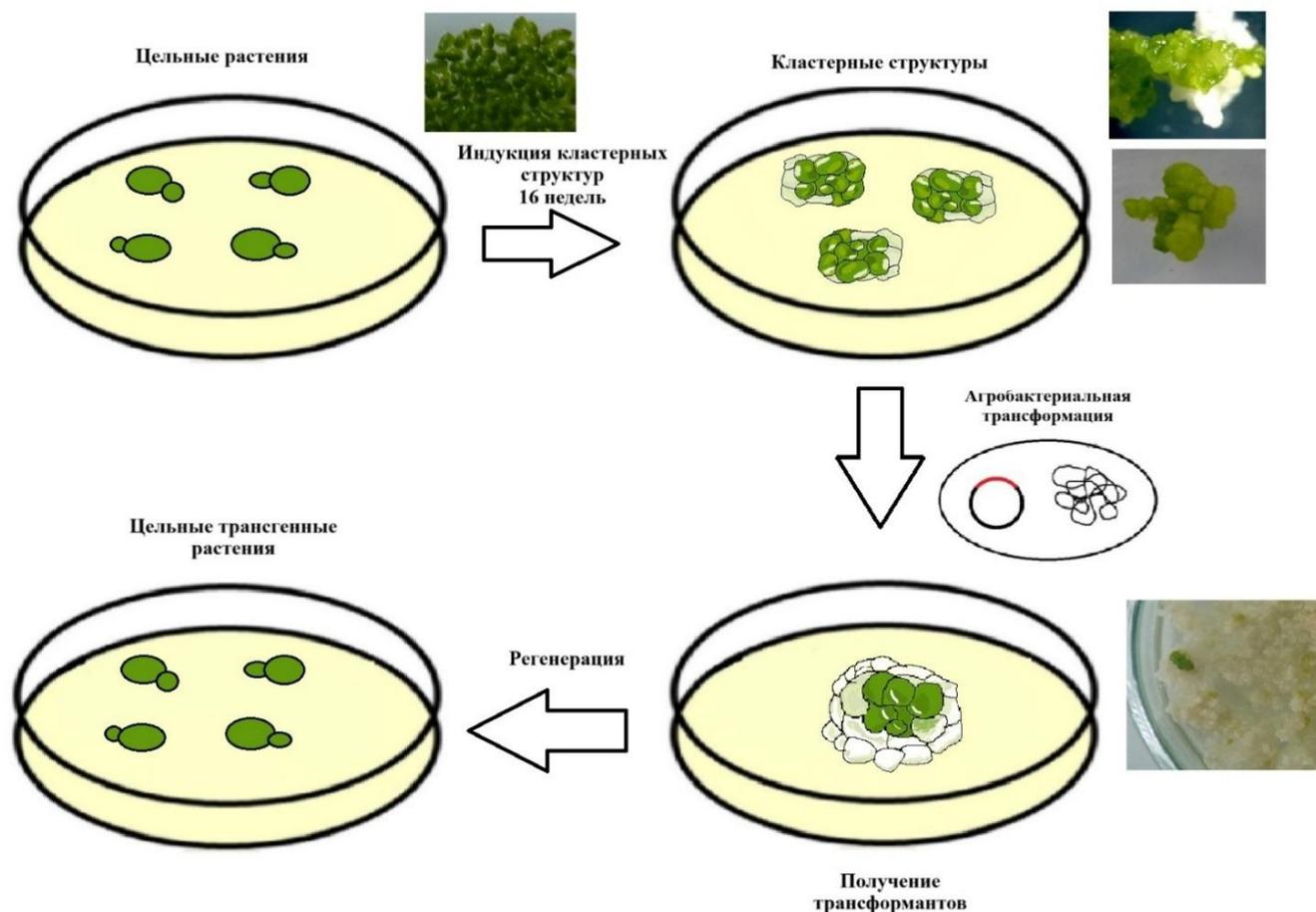


Рисунок 14. Схематическое изображения процесса получения трансгенных растений вольфии бескорневой

После воздействия агробактерией на прекультивированные экспланты вольфии получение трансгенных растений занимает довольно длительный период времени. До того момента пока не размножатся регенеранты исследование растений невозможно. Только после получения необходимого количества материала растения можно анализировать различными методами.

Такая биологическая особенность вольфии бескорневой не позволяет анализировать первичные трансформанты. А сами они являются клонами того самого первого растения, которые размножаются дальше и являются одной клоновой линией. Также, длительность периода регенерации и последующего периода размножения сильно снижает вероятность появления химерных растений.

Один из первых анализов, проведенных с размножившимися растениями – ПЦР. Результаты были следующие – почти все трансгенные линии содержали вставки целевых генов. Контаминации агробактериальными генами *virC1* группы в проанализированных образцах не было (рис. 15).

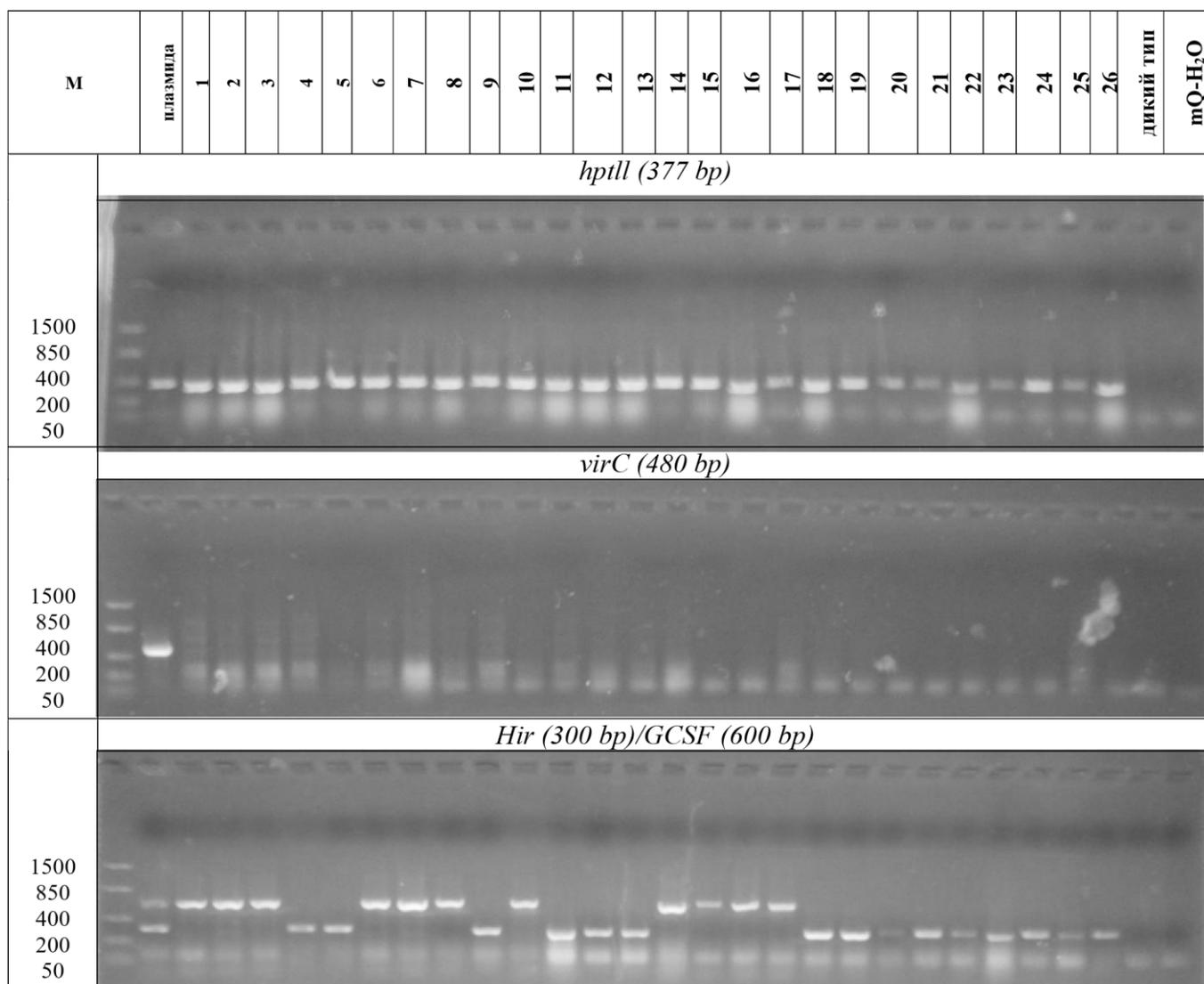


Рисунок 15. Электрофореграмма продуктов ПЦР, где М - маркер молекулярных масс, дикий тип – не трансгенное растение, mQ H₂O – отрицательный контроль для проверки чистоты реактивов, а 1-26 – анализируемые образцы

Все 34 полученные гигромицин-устойчивые линии *Wolffia* содержали селективный ген *hptII* и целевую последовательность hG-CSF.

В результате ПЦР-анализа трансгенных линий вольфии содержащих целевую последовательность Hirudin и селективный ген *hptII* выяснилось, что 40 гигромицинустойчивых линий содержали обе последовательности, а 1 линия только последовательность устойчивости к гигромицину.

3.3 Исследование влияния регуляторов роста (2,4-D и ВА) на эффективность трансформации

Ранее в нашей лаборатории удавалось получать трансгенные популяции вольфии с интеграцией в геном различных векторных конструкций (Khvatkov P., 2015, 2018, 2021). В ранних исследованиях было описано получение 4 трансгенных линий вольфии. Эффективность трансформации не превышала 0,4%. Было установлено, что для успешной трансформации вольфии бескорневой необходимо присутствие в среде 2,4-D совместно с ВА, а предпочтительное время культивирования эксплантов на среде с добавлением регуляторов роста составляет 2 недели. При более продолжительной культивации эксплантов на средах с добавлением 2,4-D совместно с ВА стабильной трансформации вольфии не наблюдалось. Исходя из полученных данных возникла необходимость более детального изучения влияния регуляторов роста на эффективность трансформации вольфии. Для проверки предположения о том, что регуляторы роста 2,4-Д и ВА в течение первых двух недель селекции и культивирования эксплантов влияют на эффективность трансформации был проведен эксперимент, результаты которого представлены в таблице 3 и таблице 4.

Таблица 3. Дисперсионный анализ результатов эксперимента по изучению влияния 2,4 – D и BA на эффективность трансформации вольфии

| Источник изменчивости | Сумма квадратов | Степени свободы | Средний квадрат | Fфакт. |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
| Общая | 2685,354 | 74 | - | - |
| Варианты | 2496,220 | 24 | 104,0092 | 27,496* |
| фактор 1 (концентрация 2,4 – D) | 393,465 | 4 | 98,3664 | 26,004* |
| фактор 2 (концентрация BA) | 788,047 | 4 | 197,0117 | 52,083* |
| Взаимодействие 1X2 | 1314,708 | 16 | 82,1692 | 21,723* |
| Ошибки | 189,134 | 50 | 3,7827 | - |

*-указывает на значимость факторов при P=95%, $S_x=1,123$, $S_{x\%}=28,980\%$, НСР (для сравнения любых средних)=3,189; НСР (для средних по фактору 1)=1,426; НСР (для средних по фактору 2)=1,426. Данные преобразовывались через угол-арксинус $\sqrt{\text{процент}}$.

В эксперименте было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4 – D и BA (2,4 – D в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л совместно с BA в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трехкратной повторности по 65 чашек Петри (≈ 3250 эксплантов) каждый. Оптимизацию условий трансформации осуществляли на среде SH с добавлением тиментина 100 мг/л для элиминации агробактерии и гигромицина 5 мг/л для селекции трансгенной ткани. Первый пассаж (2 недели) эксплантов осуществляли на средах с добавлением 2,4-D и BA, далее экспланты культивировали на безгормональной среде с добавлением соответствующих антибиотиков. Все растения, сформировавшиеся на одной чашке Петри, принимались за одну трансгенную популяцию.

Для сравнения множества комбинаций концентраций регуляторов роста 2,4-D и BA в работе был использован критерий Дункана. В таблице 4 представлены результаты распределения величин наблюдаемых средних. Анализ данных

эффективности трансформации вольфии показал, что, распределение величин, отличалось от нормального. При увеличении концентрации 2,4-D с 1,0 до 2,0 мг/л в присутствии 1,0 мг/л ВА эффективность трансформации была одинаковой, а при 2,5 мг/л 2,4-D снижалась. В присутствии ВА в концентрации от 1,5 мг/л, а 2,4-D до 2,5 мг/л эффективность повышалась. В присутствии 2,0 мг/л ВА эффективность трансформации повышалась при увеличении концентрации 2,4-D с 1,0 до 2,0 мг/л, но дальше не менялась. Средние показатели влияния ВА в результативных вариантах (в концентрациях 1,0; 1,5 и 2,0 мг/л) на эффективность трансформации вольфии статистически достоверными отличиями не обладали и составляли 0,2%. Средние показатели влияния 2,4-D на эффективность трансформации вольфии в результативных вариантах (1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мг/л) росли по мере увеличения концентрации этого регулятора роста, хотя четкой зависимости между вариантами не было выявлено (Шведова А.Н., 2022).

Таблица 4. Влияние различных концентраций 2,4-D и ВА, а также их комбинаций на эффективность трансформации *Wolffia arrhiza*

| Эффективность трансформации*, % | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------|--------------|-------|---------|
| Концентрация 2,4-D, мг/л | Концентрация ВА, мг/л | | | | | Среднее |
| | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 | |
| 0.5 | 0.0 a | 0.0 a | 0.0 a | 0.0 a | 0.0 a | 0.0 |
| 1.0 | 0.0 a | 0.37 lm | 0.08 cdef | 0.10 defg | 0.0 a | 0.14 |
| 1.5 | 0.0 a | 0.32 ijklm | 0.11 efg | 0.17 fghi | 0.0 a | 0.15 |
| 2.0 | 0.0 a | 0.28 hijklm | 0.21 ghijklm | 0.36 jklm | 0.0 a | 0.21 |
| 2.5 | 0.0 a | 0.05 bcde | 0.54 m | 0.37 klm | 0.0 a | 0.24 |
| Среднее | 0.0 | 0.20 | 0.19 | 0.20 | 0.0 | |

*Примечание: Различные буквы указывают на достоверную принадлежность данных к отдельному (в случае присвоения одной буквы) или множественному (в случае присвоения нескольких букв) кластеру согласно методике Дункана. Среднее – среднее значение эффективности трансформации по содержанию 2,4-D и ВА соответственно

Согласно анализу по критерию Дункана показано, что кластеру *m* (кластер родственных выборок в нашем исследовании) принадлежит 7 из 12 результативных вариантов комбинаций регуляторов роста. На основе этих данных было выдвинуто предположение, что для эффективной трансформации важна не столько концентрация каждого регулятора роста, как их баланс в среде для культивирования эксплантов. При анализе вариантов по показателю отношения 2,4-D/BA установлено, что наибольшую эффективность стабильной трансформации вольфии статистически достоверно регистрировали при соотношении 1,67 (рис. 16).

Таким образом, максимальная эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* составила 0,54% при использовании для селекции и культивирования инокулированных эксплантов на первом пассаже среды SH с 2,5 мг/л 2,4-D и 1,5 мг/л BA.

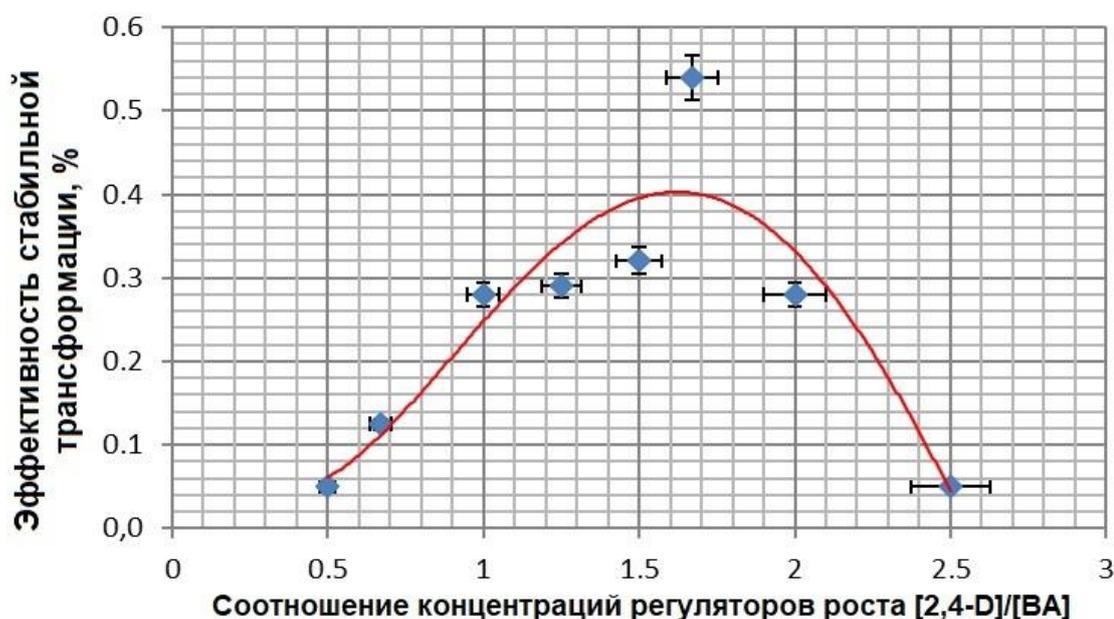


Рисунок 16. Влияние соотношения концентраций регуляторов роста ([2,4-D]/[BA]) на эффективность стабильной трансформации *Wolffia arrhiza*.

В ходе данного эксперимента было показано, что для эффективной стабильной трансформации наиболее важен именно баланс (соотношение) 2,4-D/BA в среде для культивирования эксплантов. В результате проведенного

исследования эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* относительно исходного протокола (Khvatkov P., 2015) с 0,2% удалось повысить до 0,4-0,5% на 100 эксплантов.

3.4 Анализ трансгенных растений *W. arrhiza*, содержащих гены гирудина и ГКСФ

3.4.1 Анализ растений, трансформированных плазмидой pCamHIR

Накопление рекомбинантного гирудина было изучено в 20 случайно отобранных независимых трансгенных линиях. По данным ИФА гирудин накапливался только в 3х линиях, а в остальных 17 линиях гирудин не детектировался. Значения оптической плотности (ОП), полученные в результате ИФА для этих линий, достоверно не отличались от соответствующих значений для нетрансгенного контроля. Наибольшие уровни накопления гирудина наблюдались в линии **Wh15** $775,5 \pm 111,9$ нг / г зеленой массы, в линиях **Wh09** и **Wh19** накопление гирудина было ниже - $766,4 \pm 98,9$ и $534,5 \pm 109,6$ нг/г зеленой массы соответственно. Следует отметить, что различия в накоплении гирудина в линиях Wh09, Wh15 и Wh19 статистически не существенны (рис.17).

Поскольку числовые значения накопления гирудина в трансгенных растениях слишком малы в следствии слишком низкого накопления гирудина (удалось зафиксировать нанограммы) оставшиеся линии не подвергались анализу методом ИФА. (Khvatkov P., 2021).

Вестерн-блот анализ проводился только для трех линий: Wh09, Wh15 и Wh19. В результате анализа гирудин был обнаружен только у одной трансгенной линии – Wh15, из 3 исследованных.

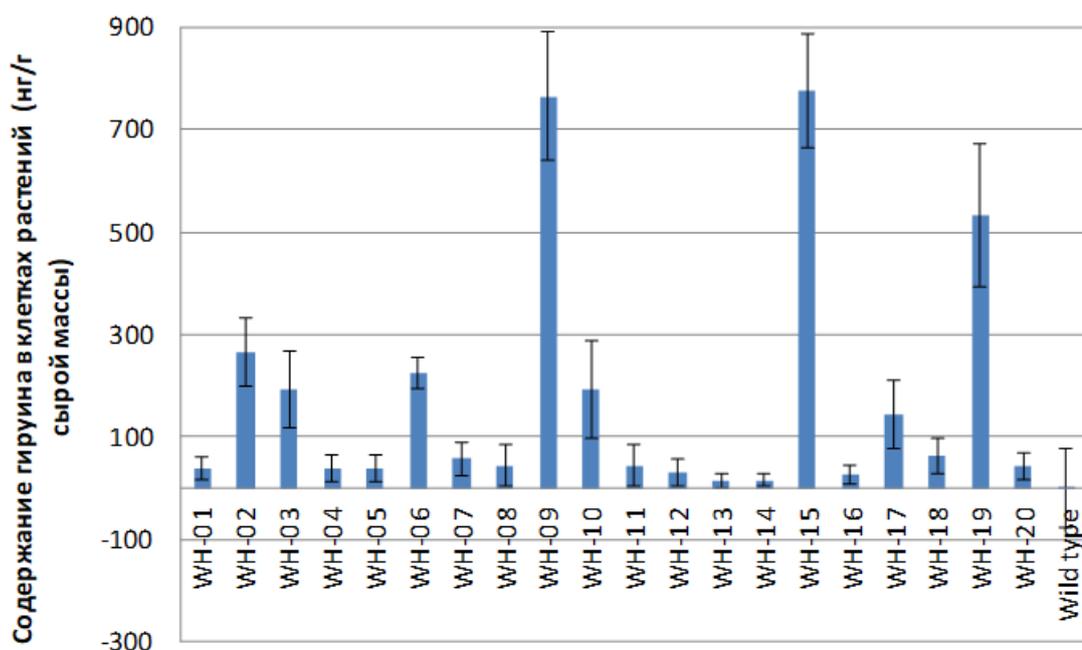


Рисунок 17. Результаты ИФА 20 трансгенных линий *Wolffia* содержащих ген гирудина

Гирудин в трансгенной вольфии мигрировал в геле с той же скоростью, что и контрольный белок. Это подтверждает расщепление N-концевого сигнального пептида α -амилазы риса и указывает на правильный процессинг прегирудина в растениях *Wolffia*. В контрольном образце белка из растений дикого типа (не трансгенных) не наблюдали иммунореактивной полосы соответствующей гирудину. (рис.18)

Саузерн-блот анализа для растений, трансформированных плазмидой pCamHIR. Для саузерн-блот анализа были отобраны три линии с высоким содержанием гирудина и еще 7 линий с низким накоплением целевого белка. Всего в анализе было десять трансгенных линий. Полученные результаты подтвердили интеграцию гена гирудина в геном *Wolffia*. В исследуемых образцах были обнаружены от 1го до 6 локусов интеграции в геном вольфии (рис.18).

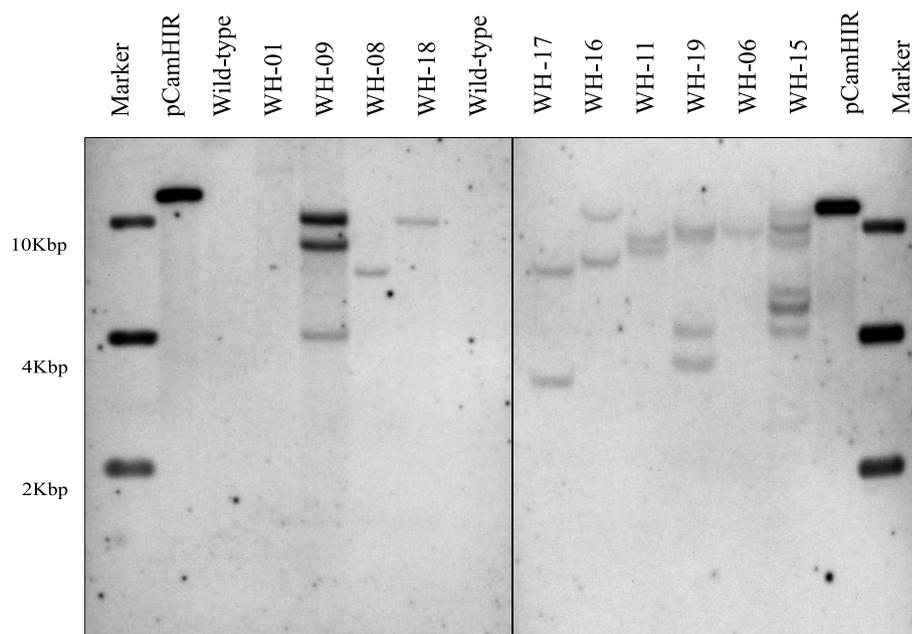


Рисунок 18. Саузерн-блот анализ линий вольфии с интеграцией гена гирудина

Таким образом, была показана возможность экспрессии рекомбинантного гирудина в геномно-трансформированных растениях *Wolffia*.

3.4.2 Нароботка гирудина в растениях вольфии бескорневой

В проведенном исследовании накопление рекомбинантного гирудина в трансгенных растениях вольфии Wh15 составляло около 800 мкг/кг сырой массы (соответствует 0,02% от ОРБ), что значительно ниже чем в некоторых случаях экспрессии в системах ряски если рассматривать процентное соотношении от ОРБ 0,036 до 1,96%. (Tan, X. et al., 2022; Firsov et al., 2015, 2018; Sun et al. 2007) Не так много исследователей смогли получить достойный уровень экспрессии гирудина. Нуклеотидные последовательности гена гирудина и регуляторные элементы, введенные в плазмиду pCamHIR, ранее использовали для трансформации ряски. И это не слитый белок гирудина-олеозина. Была теория, что высокая активность целевой мРНК, как и в работе Козлова с соавторами в 2019 на *Lemna minor*, могла бы показать и в нашем исследовании высокий

уровень экспрессии. К сожалению, теория не подтвердилась. Как и в предыдущем исследовании уровень наработки белка не повысился, а остался идентичным – 0,02% от ОРБ.

В результате саузерн-блот анализа было отмечено от 1го до 6 локусов интеграции в геном вольфии, таким образом было выдвинуто предположение о том, что наибольшее количество интеграций в геном гена гирудина способствует повышению выхода целевого белка. Такие примеры можно наблюдать на 3х отмеченных линиях (Wh15, Wh09, Wh19). Такое предположение необходимо проверить на другом целевом белке, у которого выход мог бы быть существенно больше (на нашем примере это ГКСФ) и фиксация результата была бы проще. Тем не менее имеются и предположения относительно низкого уровня накопления гирудина — это его нестабильность в тканях растений ряски, в частности деградация за счет протеолитических ферментов в растении-продуценте. Возможно, условия пространства апопласта ряски, в том числе его протеолитический фон, не оптимальны для накопления рекомбинантного гирудина. Оптимизация продукции гирудина в тканях растений по-прежнему требует поиска эффективных гликоинженерных методов синтеза этого пептида. Накопление рекомбинантного гирудина в трансгенных растениях *Wolffia* может быть увеличено либо путем интеграции конструкций с сигналами локализации пептида в другие, более подходящие, клеточные компартменты, такие как эндоплазматический ретикулум, либо путем экспрессии в составе более стабильного слитого белка, как это было продемонстрировано Фирсовым и соавт. (2015) на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1, слитого с β -глюкуронидазой.

В мире для производства гирудина растительные экспрессионные системы не используются. Анализ литературы, а также проведенные исследования в данной диссертации подтверждают сложность наработки гирудина в растительной платформе. В результате исследования были впервые получены трансгенные растения *Wolffia*, экспрессирующие рекомбинантный гирудин человека. Одна из

поставленных задач диссертации была – получение растений с целевым геном гирудина. Важно отметить, что задача стояла очень сложная – получить выход чистого белка, не слитого со вспомогательными структурами. Максимальное накопление гирудина в линии Wh15 составило 775,5нг/г сырого веса, в линиях Wh09 766,4нг/г и Wh19 534,5 нг/г. Учитывая особенности такого сложного для воспроизводства пептида такие показатели являются неплохим достижением для мирового сообщества. (Интересно, что существуют целые международные форумы по рясковым, на которых обсуждаются в том числе и такие интересные исследования как наше.)

Полученные результаты в ряске, как экспрессионной системе, а именно вольфии бескорневой, открывают большой потенциал для исследования новых путей по оптимизации таких сложных и неоднозначных рекомбинантных белков как гирудин. Собранные данные будут в дальнейшем использованы в исследованиях по совершенствованию генетических конструкций для экспрессии рекомбинантного гирудина в растительных экспрессионных системах.

3.4.3 Анализ растений, трансформированных плазмидой pCamGCSF

Аккумуляция рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора была изучена в 34 трансгенных линиях. По данным ИФА ГКСФ накапливался в 33 из 34 трансгенных линий. Количественное определение целевого белка в трансгенных растениях *Wolffia* с использованием ИФА показало накопление от 0,36 до 35,5 мг на 1 кг зеленой массы *Wolffia* (таблица 5).

Самые высокие уровни накопления ГКСФ наблюдались в линиях WG-04 и WG32 (33,9 и 35,5 мг на кг зеленой массы).

Таблица 5. Количественное содержание ГКСФ в растительных тканях

| Название трансгенных линий | Содержание ГКСФ в растительных тканях | | |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | Содержание целевого белка ОРБ (%) | мг/ 100 г сухой массы | мг/кг зеленой массы |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| WG-01 | 0.005 ± 0.002 | 1.97 a | 0.95 a |
| WG-02 | 0.037 ± 0.017 | 13.69 ab | 6.57 ab |
| WG-03 | 0.014 ± 0.006 | 5.18 ab | 2.49 ab |
| WG-04 | 0.191 ± 0.052 | 70.67 de | 33.85 de |
| WG-05 | 0.011 ± 0.006 | 4.07 a | 1.95 a |
| WG-06 | 0.087 ± 0.070 | 32.19 bc | 15.45 bc |
| WG-07 | 0.008 ± 0.004 | 2.96 a | 1.42 a |
| WG-08 | 0.009 ± 0.001 | 3.33 a | 1.60 a |
| WG-09 | 0.002 ± 0.001 | 0.74 a | 0.36 a |
| WG-10 | 0.004 ± 0.003 | 1.48 a | 0.71 a |
| WG-11 | 0.007 ± 0.002 | 2.59 a | 1.24 a |
| WG-12 | 0.004 ± 0.003 | 1.48 a | 0.71 a |
| WG-13 | 0.003 ± 0.001 | 1.11 a | 0.53 a |
| WG-14 | 0.002 ± 0.001 | 1.07 a | 0.36 a |
| WG-15 | 0.007 ± 0.004 | 2.59 a | 1.24 a |
| WG-16 | 0.008 ± 0.002 | 2.96 a | 1.42 a |
| WG-17 | 0.008 ± 0.004 | 2.96 a | 1.42 a |
| WG-18 | 0.005 ± 0.002 | 1.85 a | 0.89 a |
| WG-19 | 0.006 ± 0.001 | 2.22 a | 1.06 a |
| WG-20 | 0.005 ± 0.003 | 1.85 a | 0.89 a |
| WG-21 | 0.005 ± 0.002 | 1.85 a | 0.89 a |
| WG-22 | 0.006 ± 0.001 | 2.22 a | 1.07 a |
| WG-23 | 0.006 ± 0.004 | 2.22 a | 1.0 a |
| WG-24 | 0.033 ± 0.021 | 12.21 ab | 5.86 ab |
| WG-25 | 0.008 ± 0.001 | 2.96 a | 1.42 a |
| WG-26 | 0.005 ± 0.003 | 1.85 a | 0.89 a |
| WG-27 | 0.010 ± 0.001 | 3.70 a | 1.78 a |
| WG-28 | 0.000 ± 0.000 | 0.00 a | 0.00 a |

| | | | |
|--------------|----------------------|----------------|----------------|
| WG-29 | 0.010 ± 0.004 | 3.70 a | 1.78 a |
| WG-30 | 0.028 ± 0.008 | 10.36 ab | 4.97 ab |
| WG-31 | 0.006 ± 0.004 | 2.22 a | 1.07 a |
| WG-32 | 0.194 ± 0.060 | 71.78 e | 34.45 e |
| WG-33 | 0.119 ± 0.023 | 44.03 c | 21.13 c |
| WG-34 | 0.004 ± 0.003 | 1.48 a | 0.71 a |
| Контроль | 0.000 ± 0.000 | 0.00 a | 0.00 a |

Примечание* различные буквы в столбце указывают на существенные различия в данных вариантов согласно критерию Дункана.

Вестерн-блот с использованием антител к ГКСФ выявил: наличие полосы 20 кДа, соответствующей рекомбинантному hG-CSF в 33 из 34 исследованных трансгенных линиях вольфии (рис. 19). В контроле не наблюдалось иммунореактивных полос. А максимальное накопление hG-CSF наблюдалась в линиях WG-04 и WG-32, в остальных линиях накопление целевого белка было существенно ниже.

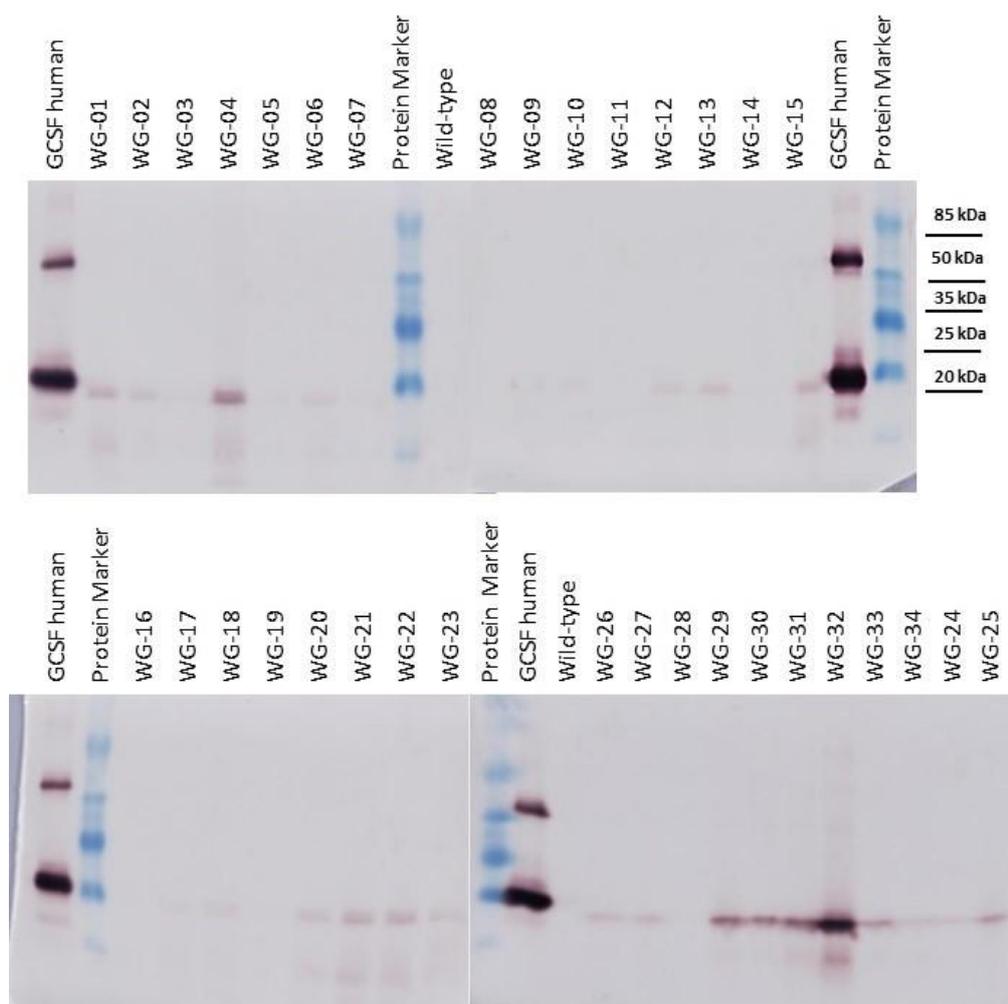


Рисунок 19. Вестерн-блот экспрессии ГКСФ в трансгенных линиях вольфии. Protein Marker - маркер молекулярного размера TS 26612 Protein MW Marker; GCSF human - рекомбинантный ГКСФ (200 нг; AbCam, Великобритания).

Результаты саузерн-блот анализа для растений, трансформированных плазмидой pCamGCSF. Саузерн-блот анализ был проведен для исследования 11 трансгенных линий. Для этого отбирались линии с различным уровнем белкового продукта - нулевым, средним, высоким и низким (рис.19, 20).

Полученные результаты подтвердили интеграцию гена ГКСФ в геномную ДНК *Wolffia* (рис.20). В исследуемых образцах были обнаружены от 1-го до 7 локусов интеграции в геном вольфии. Один локус интеграции в образцах 2, 8, 24, и 27, два - в образцах 17, 19, 28, четыре - в 6 и 33, пять - в 4, 7 локусов в 32 образце. Данная ситуация характерна для агробактериальной трансформации. ДНК нетрансформированных растений не удалось гибридизовать с зондом.

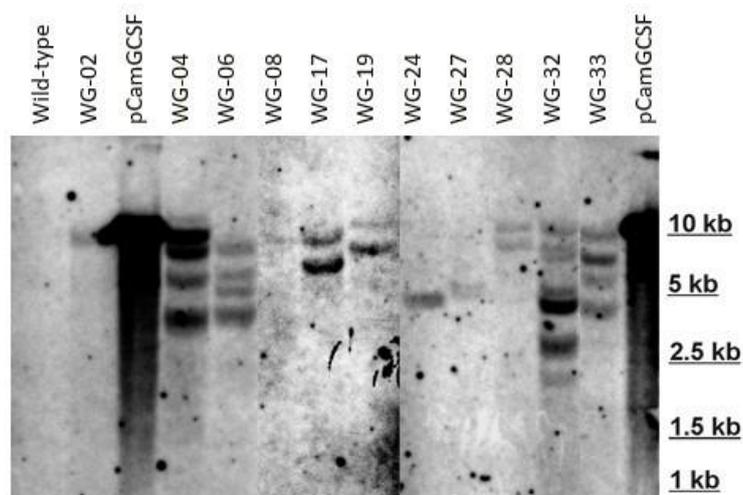


Рисунок 20. Результаты саузерн-блот анализа для 11 трансгенных линий вольфии с разным уровнем накопления ГКСФ

3.4.4 Нарботка ГКСФ в растениях вольфии бескорневой

В исследовании была выявлена существенная вариабельность накопления целевого белка среди трансгенных линий. Вариации в экспрессии рекомбинантного белка между независимо полученными трансгенными линиями являются часто встречающимся явлением (Richter et al., 2000; Sharma and Sharma, 2009). Зачастую они связаны с различиями в количестве копий трансгена или в положении в геноме, в которое интегрировалась чужеродная ДНК (Долгова и др., 2015). Оба эти фактора могут быть применены к полученным трансгенным линиям *W. arriza* (рис. 20).

Саузерн-блот-анализ показал заметные различия между изученными линиями как по количеству трансгенных вставок, так и по местам их интеграции в геном растения. Несмотря на поликопийность инсерций гена ГКСФ (рис. 21) в геноме наиболее продуктивных линий вольфии (WG-04 и WG-32), выход целевого продукта с 1 кг сырой массы продуцента был на уровне свыше 30 мг/кг сырой массы. Наименее продуктивные линии имели от 1 до 4 интеграций гена. Таким образом предположение о взаимосвязи мультикопийности и наибольшего выхода

белкового продукта носит прямой характер. Это прослеживалось в опытах на примере гирудина, далее подтвердилось в экспериментах с ГКСФ.

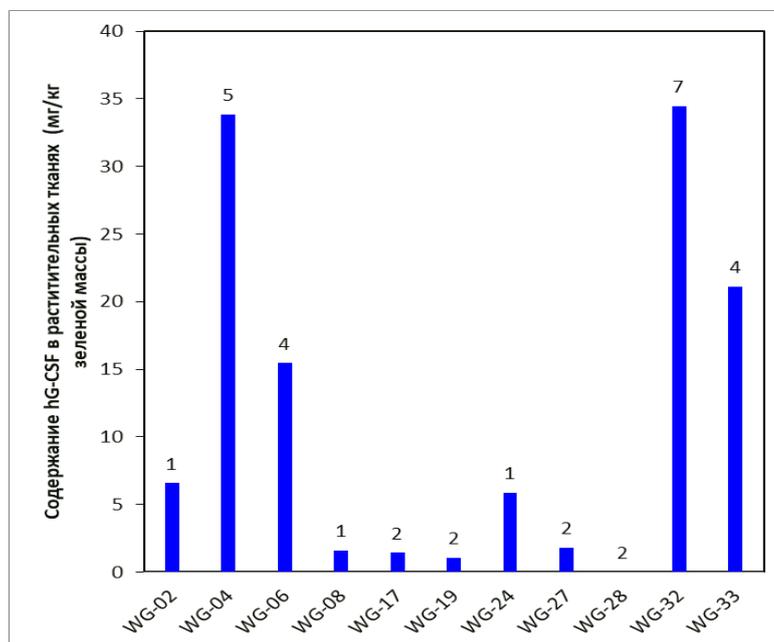


Рисунок 21. Результаты ИФА 11 трансгенных линий вольфии содержащих ген ГКСФ (цифры показывают количество инсерций гена ГКСФ в геноме трансгенной линии)

В результате исследования были впервые получены трансгенные растения *Wolffia*, экспрессирующие рекомбинантный ГКСФ. В двух линиях - WG-04 и WG-32 - целевой белок накапливался на высоком уровне - примерно 35 мг рекомбинантного белка на 1 кг сырой массы *Wolffia*. Таким образом, на примере hG-CSF можно говорить о высоком потенциале вольфии бескорневой как продуцента рекомбинантных белков.

Сложилась интересная ситуация, не характерная при наличии многочисленных копий. Некоторые исследователи придерживаются мнения, что количество копий гена далеко не всегда прямо коррелирует с эффективностью экспрессии гена (Meza et al., 2002; Nagaya et al., 2005). В таком случае произошло бы замолкание и мы бы не увидели экспрессию наших целевых белков. Но мы получаем обратную

ситуацию, чем больше интеграций целевых генов в геном вольфии мы имеем, тем больше продукта получаем. Таким образом агробактериальная трансформация является хорошим вариантом для получения трансгенных растений вольфии с мультикопийными вставками нужных нам генов. Также вольфия бескорневая имеет большое преимущество как экспрессионная система, можно не углубляться в анализ мультикопийности боясь замолкания белкового продукта.

3.5 Анализ накопления целового белка (ГКСФ) в культуральной среде

Поскольку вольфию потенциально можно использовать как платформу для экспрессии и трансфера растениями белка в среду было произведено изучение культуральной среды в биореакторе. Для изучения накопления целевого белка ГКСФ в культуральной среде, из всех проанализированных линий растений, была выбрана линия WG-32. Высокое содержание белка в тканях (35,5 мг на кг зеленой массы) делают ее весьма перспективной.

В результате наблюдений было отмечено, что рост содержания ГКСФ начинается только тогда, когда прирост растительной биомассы достигает половины от максимально возможного значения (рис.22). Что, по-видимому, является наиболее благоприятным условием для наработки белка в среде.

Полученные зависимости для растительной биомассы и содержания ГКСФ аппроксимируются степенными зависимостями 2го и 3го порядка. Наблюдаемый рост накопления биомассы может быть описан экспоненциальной функцией. От 0 до 12 дня с меньшей зависимостью, с 12 до 40 дня резкий прирост биомассы, а после 40 дня наблюдается насыщение. Порядка четверти всего нарабатываемого в вольфии ГКСФ успешно транспортировалось в среду культивирования, что позволяет говорить не только об эффективности использования вольфии в качестве платформы для биофарминга, но и предположить достаточную рентабельность производства лекарственных препаратов, с использованием получаемого ГКСФ, при коммерческой реализации данной работы.

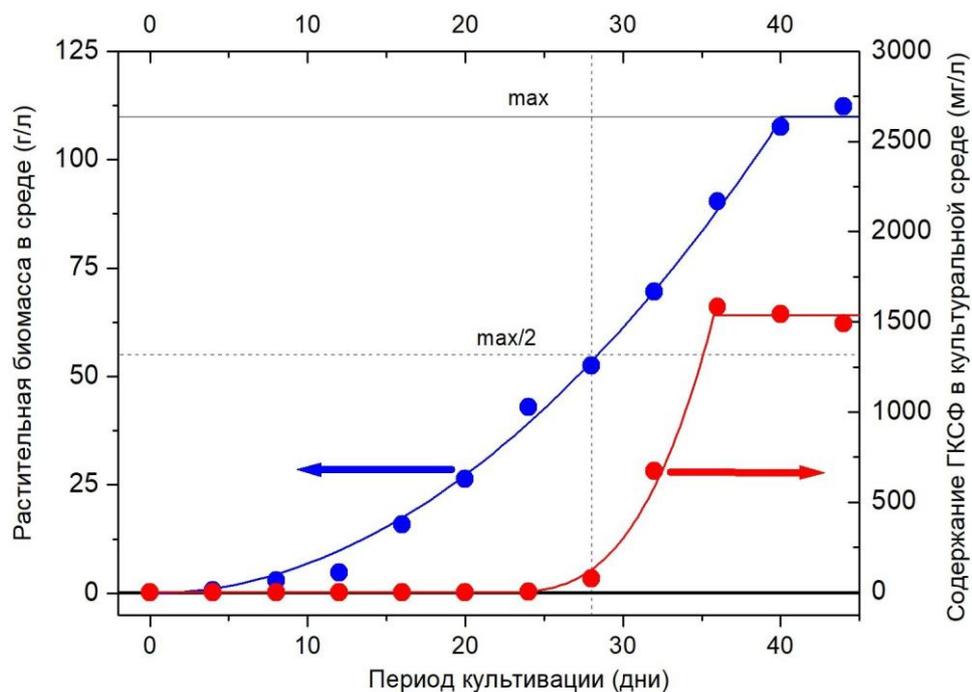


Рисунок 22. Динамика прироста биомассы *Wolffia arrhiza* (линия - WG-32) и динамика накопления hG-CSF в культуральной среде

3.6 Возможные перспективы вольфии бескорневой как потенциальной экспрессионной платформы

Растения вольфии содержащие рекомбинантные белки могут стать очень перспективными в животноводстве. Поскольку возможно с помощью ряски разнообразить рацион питания домашних птиц и животных, а также становится возможным применение пассивной вакцинации., которая может способствовать снижению заболеваемости животных в хозяйствах.

В случае выделения белка в среду можно говорить о менее трудоемком процессе выделения и очистки рекомбинантных белков, чем из растительной ткани. А производство рекомбинантных вакцин на растительной основе, в частности вольфии бескорневой, может стать все более привлекательным в современном мире.

Если сравнивать два рекомбинантных белка которые удалось получить в предлагаемой растительной экспрессионной системе, то можно сделать вывод о том, что она, как и все остальные экспрессионные системы не является оптимальной для всех белков. Как показали эксперименты, данная система может удачно подойти для наработки рекомбинантных цитокинов. Для наработки такого непростого пептида как гирудин, данная экспрессионная система подходит меньше всего, если ее не модифицировать. Если производить дальнейший поиск и оптимизацию параметров, то скорее всего растительная система станет доступнее. Неоспоримый плюс в ней — это возможность нарабатывать белок не только в самом растении, а также его локализация в жидкой среде.

За последние 30 лет вышло не так много статей, посвященных успешному созданию постоянных трансгенных растений из рясковых. Одна из первых работ, посвященных созданию рекомбинантного гирудина, была отмечена в статье Parmenter D.L. с соавторами в 1995 году, когда они получили слитый белок олеозин-гирудин в семенах *Brassica napus*. (Parmenter D.L. et al., 1995). Уровень экспрессии такого слитого белка составлял 1%, но такой белок не обладал антитромбиновой активностью, а для получения нужных свойств белок нужно отделять от олеозина. Второе сообщение об успешном получении рекомбинантного гирудина уже в рясковых, в таком представителе как *Lemna minor* было от Kozlov O. N. с соавторами в 2018 году. Максимальное накопление гирудина составляло 0,02% от общего количества растворимого белка. (Kozlov O. N. Et al., 2018). Накопление белка сопоставимо с результатом, полученным в моей работе (такие же 0,02% от ОРБ в вольфии бескорневой). К настоящему времени в литературе не наблюдается работ, посвященных накоплению рекомбинантного гирудина в растениях. Скорее всего отсутствие работ связано с особенностями экспрессии данного пептида в растительных клетках. Его скорая деградация или же необходимость белка-партнера с дальнейшей очисткой, что мало выгодно для производства.

Что характерно, то статей, посвященных наработке рекомбинантного ГКСФ несколько больше. Данный пептид легче в воспроизводстве и сообщений про экспрессию ГКСФ в суспензионных культурах можно встретить чаще. Касательно экспрессии данного пептида в рясковых, сообщений, кроме наших статей нет. Наибольший показатель выхода рекомбинантного ГКСФ при наработке в листьях табака был отмечен в статье Tabar M. S в 2012 году и составил 105 мг/л. На этом ограничивается количество статей с сопоставимыми показателями экспрессии рекомбинантного цитокина в растениях. Если сравнивать данное значение, то в нашей работе мы имеем 35 мг/л. При этом мы имеем трансгенные линии, выход белка в среду и возможность культивирования растений в биореакторах, следовательно, можно получать еще большие количества белка не тратя площади на выращивание потенциальных растений в грунте. А также, не получая негативных последствий и соединений в тканях вольфии, в отличие от тканей табака.

Таким образом можно сделать общий вывод о том, что трансформация растений *Wolffia arrhiza* с целью получения некоторых рекомбинантных белков, в частности гранулоцитарного колониестимулирующего фактора может быть оправдана. А наработка сложно воспроизводимых пептидов, таких как гирудин, требует доработки и дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В теоретической части работы были проанализированы основные тенденции развития отрасли растительного биофарминга. Эта отрасль всё больше привлекает внимание не только исследователей во всем мире, но и крупные фармацевтические компании, как следствие наблюдается повышение инвестиций в данную сферу. Увеличение заболеваемости вирусными и бактериальными инфекциями вызывает высокий спрос на вакцины и терапевтические средства, а растения-продуценты рекомбинантных белков помогают ускорить разработку и поставку фармакологических препаратов на рынок. Растения семейства *Legnaseae*, в частности вольфия бескорневая (*W. arrhiza*), способны стать эффективными продуцентами. Ряски уже используются в качестве модельных растений для изучения генетики, физиологии растений, мониторинга окружающей среды и экологии, а также являются инструментом для поиска противомикробных химических веществ. В первой главе также отмечается, что до сих пор не было в достаточном объеме описана эффективная растительная система для некоторых важных (гирудина и ГКСФ) терапевтических белков, а наработка на невысоком уровне осуществляется по-прежнему на модельных объектах. Для растительного биофарминга вольфия имеет большое количество плюсов как биологических, так и экономических. Всё это позволяет описать данные растения как перспективную платформу для экспрессии рекомбинантных белков.

В результате проведенных исследований по оптимизации транзientной трансформации вольфии установлено, что после инокуляции эксплантов суспензией агробактериального штамма ЕНА105 с оптической плотностью 0.4 (OD_{600}) через 72 ч кокультивации эффективность транзientной экспрессии была максимальной – на уровне 19%. На основе этих результатов, а также ранее разработанного протокола была произведена оптимизация стабильной трансформации вольфии. Было показано, что для успешной трансформации

вольфии бескорневой вольфии важен именно баланс 2,4-D/ВА в среде для культивирования эксплантов. Предпочтительное время культивирования эксплантов на среде с добавлением регуляторов роста 2,5 мг/л 2,4-D совместно с 1,5 мг/л ВА должно составлять не более двух недель. Таким образом, эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* относительно исходного протокола (Khvatkov P., 2015) удалось повысить с 0,2% до 0,5% на 100 эксплантов.

В ходе работы было получено 34 трансгенных линии содержащих последовательность гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и 40 линий, содержащих последовательность гена гирудина. Наибольший уровень накопления гирудина наблюдался в линии Wh15 и составил 766,4 нг/г зеленой массы (соответствует 0,02% от ОРБ), что является довольно низким уровнем. Предполагается, что такая ситуация наблюдается вследствие нестабильности данного белка в тканях вольфии, в особенности деградация за счет протеолитических ферментов в растениях. Для оптимизации продукции гирудина в тканях растений требуется модификация белка для защиты от протеолитического фона самого растения, или механизмы, позволяющие как можно быстрее выводить данный белок из клетки в среду без его разрушения. Несмотря на сложность работы с данным белком, в исследованиях была продемонстрирована возможность его наработки в небольших количествах в качестве демонстрации вольфии как потенциальной экспрессионной платформы.

Отмечено, что трансгенные линии вольфии содержащие последовательность гена ГКСФ имеют довольно высокий уровень накопления данного белка. Накопление целевого белка на 1 кг зеленой массы *Wolffia* составило от 0,36 до 35,5 мг. Наибольший уровень содержания рекомбинантного ГКСФ наблюдался в двух линиях WG-04 и WG-32 (33,9 и 35,5 мг на кг зеленой массы, соответствует 0,2% ОРБ). Дальнейшие исследования по накоплению целевого белка в среде, на примере именно гранулоцитарного колониестимулирующего фактора показали, что порядка четверти всего нарабатываемого в вольфии ГКСФ успешно

транспортировалось в среду культивирования, что подводит к потенциальной рентабельности производства лекарственных препаратов при коммерческой реализации данной работы.

Полученные результаты в ходе саузерн-блот анализа показали от 1-го до 7 локусов интеграции в геном вольфии (1-6 для гирудина и 1-7 для ГКСФ). Такая ситуация характерна для агробактериальной трансформации, но, несмотря на поликопийность инсерций, даже в случае с геном гирудина, наиболее высокий уровень среди всех образцов показал вариант, где присутствуют 6 интеграций в геном растения, линия Wh15. На примере с геном hG-CSF линии с наибольшим количеством инсерций (5 и 7 в вариантах WG-04 и WG-32), оказались самые продуктивные, а выход целевого продукта с 1 кг сырой массы продуцента был на уровне свыше 30 мг/кг сырой массы. Таким образом, в случае растений вида *Wolffia arrhiza* мультикопийность вставок не является недостатком как растения продуцента, а наоборот позволяет добиться более высокого выхода рекомбинантного продукта.

В целом, анализ литературных источников и полученных экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что вольфия бескорневая может стать перспективным продуцентом в области растительного биофарминга. Также, благодаря более детальной проработке существующего протокола генетической трансформации вольфии бескорневой и повышению его эффективности удалось впервые в мире получить растения, содержащие ценные терапевтические белки - гирудин и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизация условий трансформации эксплантов вольфии бескорневой позволила повысить эффективность трансформации вольфии в 2 раза. Для этого был отобран агробактериальный штамм ЕНА105, время кокультивации составило 72 часа, а плотность агробактериальной суспензии составила 0,4 (OD₆₀₀). Присутствие на первом пассаже после агробактериальной трансформации в селективной среде 2,5 мг/л 2,4-D совместно с 1,5 мг/л ВА позволило получить стабильные трансгенные линии вольфии с эффективностью трансформации 0,54%.
2. Применение усовершенствованного протокола агробактериальной трансформации позволило получить трансгенные линии вольфии экспрессирующие рекомбинантный терапевтический белок такой как дисульфатогирудин-1, экспрессирующийся в линиях в диапазоне 534,55-775,45 нг/г сырой массы продуцента.
3. Применение усовершенствованного протокола агробактериальной трансформации позволило получить трансгенные линии вольфии экспрессирующие гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, экспрессирующийся в линиях в диапазоне от 0,36 до 35,5 мг/кг сырой массы продуцента.
4. Применение технологии культивирования вольфии в биореакторе позволило определить оптимальную плотность популяции для трансфера и экстракции рекомбинантного ГКСФ из культивационной среды. Оптимальная плотность популяции наблюдается при культивировании вольфии от 30 до 35 дней, при этом поддержание растительной биомассы в биореакторе должно составлять 85–87,5 г/л.
5. Подтверждена перспективность использования *Wolffia arrhiza* в качестве экспрессионной платформы для наработки терапевтических белков.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Войнов Н.А., Волова Т.Г., Зобова Н.В. Современные проблемы и методы биотехнологии // Электрон.учеб. пособие. – Красноярск: ИПК СФУ. – 2009. – С.418
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта // Колос, 1979. – С. 415
3. Козырева О.Г., Дунаева С.Е. Генетика и регенерация в культуре *in vitro* злаков // Генетика. – 1994. – № 10. – С. 1432-1440.
4. Костромина М. А., Есипов Р. С., Мирошников А. И. Биотехнологический способ получения рекомбинантных аналогов гирудина-1 из *Hirudo medicinalis* 2012 г. // Биоорганическая химия. – 2012, Т.38. – № 2. – С.166–176
5. Мартынов С.П. Пакет программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции / С.П. Мартынов – Тверь. – 1999.
6. Розов С.М., Пермякова Н.В., Дейнеко Е.В. Основные стратегии гликоинженерии растительных систем экспрессии для получения гуманизированных рекомбинантных фармацевтических белков // Биохимия. – 2018. – Т.83. – №3. – С.328-348
7. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / Минск: «Вышэйша школа», 1973. – с. 80-107, 187-269.
8. Савельева Н.В., Бурлаковский М.С., Емельянов В.В., Лутова Л.А. Трансгенные растения-продуценты веществ медицинского и ветеринарного назначения // Экологическая генетика. – 2015. –Т.2 – №13. – С.77-99. <https://doi.org/10.17816/ecogen13277-99>
9. Скрышник К. А., Косоруков В.С. Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор в клинической практике. // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – №4. – Т.10– 2011. – С.3-6

10. Хватков, П.А. Чернобровкина М.А., Синев В.В., Долгов С.В. Изучение условий глубинного культивирования вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm) в модифицированном биореакторе. // Биотехнология. – 2013. – №6. – С.51–56.
11. Чернобровкина М.А., Сидоров Е.А., Баранов И.А., Харченко П.Н., Долгов С.В. Влияние параметров биолистической трансформации ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) на уровень транзientной экспрессии репортерного гена *gfp* // Известия РАН. Серия биологическая. – 2007. – №6. – С. 669-775.
12. Шведова, А.Н., Хватков П.А., Долгов С.В. Оптимизация факторов, влияющих на эффективность агробактериальной трансформации *Wolffia arrhiza* // Биотехнология. – 2022. – Т.38. – №6. – С.40–46.
<https://doi.org/10.56304/S0234275822060126>
13. Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., Daniell H., Datta K., Datta S., Dix P.J., Fauquet C., Huang N., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., Nguyen T.T., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D.A., Stoger E., Taylor N., Visser R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities // Molecular Breeding. – 2005. – Vol. 15. – P. 305–327.
14. Akita M., Takayama S. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 1994. – Vol. 36. – P. 177–182.
15. Appenroth K. J. , Borisjuk N. and Lam E. Telling duckweed apart: Genotyping technologies for Lemnaceae // Chin. J. Appl. Environ. Biol. – 2013. – V.19. – P.1-10
16. Appenroth K.J., Sree K.S., Böhm V., Hammann S., Vetter W., Leiterer M., Jahreis G. Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food // Food Chem. – 2017. – V.217. – P. 266-273.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.116>

17. Arakawa T., Chong D., Langridge W. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine // *Nat. Biotechnol.* – 1998. – V.16. – P.292–297. <https://doi.org/10.1038/nbt0398-292>
18. Armstrong W. P. and Thorne R. F. The genus *Wolffia* (Lemnaceae) In California // *Madroño.* – 1984. – V.31(3). – P.171-179 Published By: California Botanical Society
19. Bagdy D., Barabas E., Graf L., Petersen T.E., Magnusson S. Hirudin / // *Methods Enzymol.* – 1976. – V.45. – P.669–678.
20. Bakker A.B., Python C., Kissling C.J. et al. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: safety, tolerability, and neutralizing activity // *Vaccine.* – 2008. – V.26. – I.47. – P.5922-5927 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.08.050>
21. Bagyan I.L., Revenkova E.V., Pozmogova G.E., Kraev A.S., Skryabin K.G. 5'-Regulatory region of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b directs organ-specific, wound-inducible and auxin-inducible expression in transgenic tobacco / // *Plant Mol. Biol.* – 1995. – V.29. – P.1299–1304. <https://doi.org/10.1007/BF00020470>
22. Barta A., Sommergruber K., Thompson D. et al. Expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue / // *The Plant Mol Biol.* – 1986. – V.6. – P.347–357 <https://doi.org/10.1007/BF00034942>
23. Bertran K., Moresco K., Swayne D.E. Impact of vaccination on infection with Vietnam H5N1 high pathogenicity avian influenza virus in hens and the eggs they lay // *Vaccine.* – 2015. – V.33. – P.1324–1330
24. Bhanthumnavin A.K.J., Sree K. S., Fakhoorian T. and Lam E. Resurgence of duckweed research and applications: Report from the 3rd International duckweed conference // *Plant Mol. Biol.* – 2015. – V.89. – P.647-654.
25. Bharathi J. K., Suresh P., Prakasha M. A. S., Muneer S. Exploring recent progress of molecular farming for therapeutic and recombinant molecules in

- plant systems // Heliyon. – 2024. – V.10(18)
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37634>
26. Boehm R., Kruse C., Voeste D., Barth S., Schnabl H. A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using Agrobacterium-mediated gene transfer // J Appl Bot. – 2001. – V.75. – P.107–111.
 27. Bog M., Appenroth K-J., Sree K.S. Duckweed (*Lemnaceae*): Its Molecular Taxonomy / // Front. Sustain. Food Syst. – 2019. – V.3. – P.117.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00117>
 28. Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V.72. – P.248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
 29. Bregitzer P., Dahleen L.S., Campbell R.D. Enhancement of plant regeneration from embryogenic callus of commercial barley cultivars // Plant Cell Reports. – 1998. – Vol. 17. – P. 941-945.
 30. Breitbach C.J., Burke J., Jonker D., et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans // Nature. - 2011. – V.477. – P.99-102 <https://doi.org/10.1038/nature10358>
 31. Buriev Z.T., S.E. Shermatov, D.E. Usmanov, M.K. Mirzakhmedov, K.A. Ubaydullaeva, V.S. Kamburova, B.K. Rakhmanov, M.S. Ayubov, A.N. Abdullaev, J.B. Eshmurzaev, B.O. Mamajonov, A.A. Tulanov, A.A. Ismailova, T.A. Petrova, R.J. Rozumbetov, T.U. Aripova, M.I. Muminov, K.Y. Ermatova, D.A. Dalimova, S.U. Turdikulova, A. Abdukarimov, I.Y. Abdurakhmonov Tomato-made edible COVID-19 vaccine TOMAVAC induces neutralizing IgGs in the blood sera of mice and humans // Front Nutr. – 2024. – V.10 <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1275307>
 32. Cameron E. / Plant-based vaccines? Medicago’s COVID Shot Leads the Way. // – 2022. <https://www.acsh.org/news/2022/03/01/plant-based-vaccines-medicagos-covid-shot-leads-way-16156>

33. Capell T., Twyman R.M., Armario-Najera V., Ma J.K., Schillberg S., Christou P. Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2 // Trends Plant Sci. – 2020. – V.25(7). – P.635-643.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>
34. Chang J.Y. Stability of hirudin, a thrombin-specific inhibitor // The structure of alkaline-inactivated hirudin. J. Biol. Chem. – 1991. – V.266(17). – P.10839–10843.
35. Chang Y., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Chen T.H.H. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex) // Plant Cell Reports. – 2003. – Vol. 21. – P. 733-738.
36. Chaudhary S., Parmenter D.L., Moloney M.M. Transgenic *Brassica carinata* as a vehicle for the production of recombinant proteins in seeds // Plant Cell Rep. – 1998. – V.17(3). – P.195–200.
37. Chen H.Y., Qi X.H., Geng X., Xu O.G., Wang J., Wu Z.R. Expression, purification and characterization of the recombinant hirudin variant III in the *Bacillus subtilis* // Adv. Mater Res. – 2012. – V.343–344. – P.753–763.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.753>
38. Cheng J.J. and Stomp A. M. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed // Clean. 2009. – V.37. – P.17-26. <https://doi.org/10.1002/clen.200800210>
39. Chikwamba R. K., Scott M. P., Mejía L. B., Mason H. S., Wang K. Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2003. – V.100. – I.19. – P.11127-11132.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1836901100>
40. Clore G.M., Sukumaran D.K., Nilges M., Zarbock J., Gronenborn A.M. The conformations of hirudin in solution: a study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics // EMBO J. – 1987. – V. 6. – I.2 – P.529–537. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb04785.x>

41. Concha C., Cañas R., Macuer J., Torres M.J, Herrada A.A., Jamett F., Ibáñez C. Disease prevention: An opportunity to expand edible plant-based vaccines // *Vaccine*. – 2017. – V.5. – I.2. – P.14–23. <https://doi.org/10.3390/vaccines5020014>
42. Cox K., Sterling J., Regan J., *et al.* Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor* // *Nat Biotechnol* – 2006. – V.24. – P.1591–1597 <https://doi.org/10.1038/nbt1260>
43. Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants, 2nd edition // Bronx: New York Botanic Gardens. – 1988.
44. Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K., Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // *Trends. Plant. Sci.* – 2001. – V.6. – I.5 – P.219-226. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01922-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7)
45. Davis J.I. A phylogenetic structure for the monocotyledons, as inferred from chloroplast DNA restriction site variation, and a comparison of measures of clade support // *Syst. Bot.* 1995. – V.20. – P.503-527.
46. De Buck, S., Windels, P., De Loose, M. et al. Single-copy T-DNAs integrated at different positions in the Arabidopsis genome display uniform and comparable β -glucuronidase accumulation levels // *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2004. – V.61. – P.2632–2645. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4284-8>
47. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A Plant DNA Miniprep: Version II // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – Vol. 1. – P. 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
48. Dodt J., Schmitz T., Schafer T., Bergmann C. Expression, secretion and processing of hirudin in *E. coli* using the alkaline phosphatase signal sequence // *FEBS Lett.* – 1986. – M.202. – P.373–377.
49. Dolgov S., Mikhaylov R., Serova T., Shulga O. and Firsov A., Pathogen-derived methods for improving resistance of transgenic plums (*Prunus*

- domestica L.) for Plum pox virus infection // Julius Kühn Arch. – 2010. – V.427. – P.133– 140.
50. Dolgova A. S., Dolgov S. V., Nazipova N. N., Maksimenko O. G. and Georgiev P. G. Arabidopsis termination elements increase transgene expression in tobacco plants // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2015. – V.120. – P.1107– 1116. doi: 10.1007/s11240-014-0667-1
51. Dubey K.K., Luke G. A., Knox C., Kumar P., Pletschke B.I., Singh P.K., Shukla P. Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools // Brief. Funct. Genomics – 2018. V.17(5). – P.295–307. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ely020>
52. Edelman M., Perl A., Flaishman M., Blumenthal A. Transgenic lemnaeae. Australian Patent Publication AU759570C, 1998. International Classification A01G 7/00; A01H 1/00; C12N 5/00; C12N 15/00.
53. Fedosov S. N., Laursen N. B., Nexø E., Moestrup S.K., Petersen T.E., Eø Jensen, Berglund L. Human intrinsic factor expressed in the plant Arabidopsis thaliana // European Journal of Biochemistry – 2003. – V.270 – I.16. – P.3362 <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03716.x>
54. Fenton J.W. 2nd, Villanueva G.B., Ofosu F.A., Maraganore J.M. Thrombin inhibition by hirudin: how hirudin inhibits thrombin // Haemostasis. – 1991. – V.1. – P.27-31. <https://doi.org/10.1159/000216259>
55. Fidan O., Secgin Z. In: Kole, C., Chaurasia, A., Hefferon, K.L., Panigrahi, J. (eds) Molecular Farming for the Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants / Applications of Plant Molecular Farming. // Part of the book series: Concepts and Strategies in Plant Sciences. Springer, Singapore. 2024. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0176-6_9
56. Filippov M., Miroshnichenko D., Vernikovskaya D., Dolgov S. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2006. – Vol. 84. –P. 192-201.

57. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Ismailova N., Shaloiko L., Vainstein A., Dolgov S. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants // Mol. Biotechnology. – 2015. – Vol. 57. – P. 653-661. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9855-4>
58. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Shaloiko L., Kozlov O., Vinokurov L., Rasskazova E., Murashev A., Vainstein A. and Dolgov S. Expression and Immunogenicity of M2e Peptide of Avian Influenza Virus H5N1 Fused to Ricin Toxin B Chain Produced in Duckweed Plants // Front. Chem. – 2018. – V.6. – P.22. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00022>
59. Franceschi V. R., Nakata P.A. Calcium oxalate in plants: Formation and Function // Annual Review of Plant Biology. – 2005. – V.56. – I.1. – P.41–71. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106
60. Franzke A. The role of G-CSF in adaptive immunity / A. Franzke // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2006. V.17. – I.4. 235–244 Mini review <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.05.002>
61. French J. C., Chung M. G. and Hur Y. K., Rudall P.J., Cribb P.J., Cutler D.F. and Humphries C.J. Chloroplast DNA phylogeny of the Ariflorae. in Monocotyledons: systematics and evolution //Royal Botanic Gardens. 1995. – V.1. – P.255-275
62. Friedrich A.S. Untersuchungen zu Kultivierung, Transformation und Fermentation von Wolffia spec. – Inaugural – Dissertation, 2005. – 177 <https://nbnresolving.org/urn:nbn:de:hbz:5N-06052>
63. Gasdaska, J.R., Spenser D., Dickey L. Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant Lemna // Bioprocess. – 2003. – Vol. 2. – P. 49-56. <https://doi.org/10.12665/J22.Gasdaska>
64. Gaydukova S.E., Rakitin A.L., Ravin N.V., Skryabin K.G., Kamionskaya A.M. Development of the Duckweed (*Lemna minor*) genetic transformation system // Ecological genetics. - 2008. - Vol. 6. - N. 4. - P. 20-28. doi: 10.17816/ecogen6420-28

65. Göritzer, K. & Strasser, R. Glycosylation of Plant-Produced Immunoglobulins. In: Pezer, M. (eds) Antibody Glycosylation. // Part of the book series *Experientia Supplementum*, 2021. – V. 1(112) Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3_16
66. Greinacher A. Lepirudin: a bivalent direct thrombin inhibitor for anticoagulation therapy // *Expert Review of Cardiovascular Therapy* – 2004. – V.2. – P.339–357. <https://doi.org/10.1586/14779072.2.3.339>
67. Greinacher A., Warkentin T.E. Contaminated heparin // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – V. 359 – I.12. – P.1291-1293. doi:[10.1056/NEJMc081387](https://doi.org/10.1056/NEJMc081387)
68. Hanlon C.A, DeMattos C.A., DeMattos C.C. et al. Experimental utility of rabies virus-neutralizing human monoclonal antibodies in post-exposure prophylaxis // *Vaccine.* – 2001. – V.19 – P.3834–42 [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00135-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00135-9)
69. Harvey R.P., Degryse E., Stefani L., Schamber F., Cazenave J.P., Courtney M., Tolstoshev P., Lecocq J.P. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis* // *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – V.83(4). – P.1084–1088.
70. Heenatigala P.P.M., Sun Z., Yang J., Zhao X., Hou H. Expression of LamB Vaccine Antigen in *Wolffia globosa* (Duck Weed) Against Fish Vibriosis // *Front. Immunol.* – 2020. – V.11. – P.1857. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01857>
71. Heenatigala P. P. M., Hou H., In: Kole, C., Chaurasia, A., Hefferon, K.L., Panigrahi, J. (eds) *Duckweed, an Efficient Green Bio-Factory for the Production of Recombinant Proteins // Applications of Plant Molecular Farming. Concepts and Strategies in Plant Sciences.* Springer, Singapore. – 2024. – V.10(18). https://doi.org/10.1007/978-981-97-0176-6_22
72. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants // *Nature.* – 1989. – V.342. – P.76–78 <https://doi.org/10.1038/342076a0>

73. Hoekema A., Roelvink P.W., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells // EMBO. – 1984. – Vol. 3. – P. 2485-2490.
74. Hong S.Y., Kwon T.H., Lee J.H., Jang Y.S., Yang M.S. Production of biologically active hG-CSF by transgenic plant cell suspension culture // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – V.30. I.6. – P. 763-767 [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00055-8)
75. Hong S.Y., Kwon T.H., Jang Y.S., Kim S.H., Yang M.S. Production of bioactive human granulocyte-colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension cultures // Protein Expression and Purification. – 2006. – V.47. – I.1. – P.68-73 <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.028>
76. Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L.S, Hoekema A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants // Transgen. Res. – 1993. – V.2. – P.208–218. <https://doi.org/10.1007/BF01977351>
77. Hu Z., Zhang N., Gu F., Li Y., Deng X., Chen G. Expression, purification and characterization of recombinant targeting bifunctional hirudin in *Pichia pastoris* // Afr J Biotech. – 2009. – V.8. – I.20. – P.5571–5577
78. Hutchinson J. The families of flowering plants, arranged according to a new system based on their probable phylogeny // Oxford University Press. – 1973. – V.2. – I.3.
79. Ilan A., Ziv M., Halevy A.A. In vitro propagation in liquid culture and acclimatization of *Brodiaea* // Scientia Hort. 1995. V. 63. P. 101–112.
80. Iqbal O., Tobu M., Aziz S., Gerdisch M., Da Valle M., Demir M., Hoppensteadt D.A., Ahmad S., Walenga J.M., Fareed J. Successful Use of Recombinant Hirudin and Its Monitoring by Ecarin Clotting Time in Patients with Heparin-Induced Thrombocytopenia Undergoing Off Pump Coronary Artery Revascularization // J. Card. Surg. – 2005. – V.20. – P.42–51. <https://doi.org/10.1111/j.0886-0440.2005.200316.x>

81. Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsh D. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – Vol. 83. – P. 8447-8451.
82. Klcova L., Havrlentova M., Farago J. Cultivar and environmental conditions affect the morphogenic ability of barley (*Hordeum vulgare* L.) scutellum derived calli // Biologia. Bratislava. – 2004. – Vol. 59(4). – P. 501-504.
83. Khvatkov P., Chernobrovkina M., Okuneva A., Pushin A., Dolgov S. Transformation of *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2015. – V.123 – P.299–307. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0834-z>
84. Khvatkov P., Chernobrovkina M., Okuneva A., Shvedova A., Chaban I., Dolgov S. Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2015. – V.120. – P.263–273. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0603-4>
85. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Shaloiko L., Dolgov S. *Wolffia arrhiza* as a promising producer of recombinant hirudin. 3 Biotech, 2021, 11, 209. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02762-3>
86. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Shaloiko L., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Tarasenko I., Chaban I., Dolgov S. Development of *Wolffia arrhiza* as a Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor // Frontiers in Chemistry. – 2018. – V.6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00304>
87. Kesik-Brodacka M. / Progress in biopharmaceutical development // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2018. – Vol.65(3) <https://doi.org/10.1002/bab.1617>
88. Kozlov O.N., Mitiouchkina T.Y., Tarasenko I.V., Shaloiko L.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. Agrobacterium-mediated transformation of *Lemna minor* L. with

- hirudin and β -glucuronidase genes // Appl. Biochem. Microbiol. – 2019. – V.55(8). – P.805–815.
89. Kruse C., Boehm R., Veste D., Barth S., Schnabl H. Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment // Aquat. Bot. – 2002. – V.72. – P.175–181. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00219-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00219-4)
90. Kuehdorf K., Appenroth K.J. Influence of salinity and high temperature on turion formation in the duckweed *Spirodela polyrhiza* // Aquat. Bot. – 2012. – V.97. – P.69–72
91. Kurup V.M., Thomas J. Edible Vaccines: Promises and Challenges // Mol. Biotechnol. – 2020. – V.62. – P.79–90. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00222-1>
92. Lacroix B. and Citovsky V. Agrobacterium // Brenner's Encyclopedia of Genetics. Reference Module in Life Sciences. – 2013. – P.52–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822563-9.00066-4>
93. Lam E., Appenroth K. J., Michael T., Mori K. and Fakhoorian T. Duckweed in bloom: The 2nd International Conference on Duckweed Research and Applications Heralds the Return of A Plant Model for Plant Biology // Plant Mol. Biol. – 2014. – V.84. – P.737-742
94. Landolt E. The family of Lemnaceae — a monographic study // Veroff Geobot Inst ETH, Stiftung Rubel, Zurich. – 1986. – V.1. – P.417–435
95. Landolt E., Kandeler R. The family of Lemnaceae - Monographic study, Vols. 1 and 2 - (Vols. 2 and 4 of Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)) // Plant Growth Regul 7. – 1988. – P.309–310. <https://doi.org/10.1007/BF00037640>
96. Lazo G.R., Stain P.A., Ludwig R.A. A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in // Nat. Biotechnol. – 1991. – V.9. – P.963-967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
97. LeBlanc Z., Waterhouse P., Bally J. Plant-Based Vaccines: The Way Ahead // Viruses. – 2020. – V.13. – P.1-5. <https://doi.org/10.3390/v13010005>

98. Lemaux, P.G., Cho M.-J., Zhang S., Bregitzer P. Transgenic cereals: *Hordeum vulgare* (barley) / P.G. Lemaux, M.-J. Cho, S. Zhang, P. Bregitzer // In: Vasil I.K. (ed). *Molecular improvement of cereal crop*. Kluwer Academic. London. – 1999. – P. 255-316.
99. Les D.H., Crawford D.J., Landolt E., John D., Gabel J.D., Rebecca K.T. Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family // *Systematic Botany*. – 2002. V.27. – I.2. – P.221–240
100. Lienard D., Tran Ding O., van Oort E., Van Overtvelt L., Bonneau C., Wambre E., Bardor M., Cosette P., Didier Laurent A., de Borne FD., Delon R., van Ree R., Moingeon P, Faye L., Gomord V. Suspension-culture BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens // *Plant Biotechnol. J.* – 2007. – V.5. – P.93-108. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00221.x>
101. Li J., Jain M., Vunsh R., Vishnevetsky J., Hanania U., Flaishman M., Perl A., Edelman M. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna* // *Plant Cell Rep.* – 2004. – V. 22. – P. 457–464.
102. Lou X. M. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants / Yao Q.H., Zhang Z., Peng R.H., Xiong A.S., Wang H.K. // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2007. – V.14 – I.4. – P.464–469. <https://doi.org/10.1128/CVI.00321-06>
103. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J Biol Chem.* – 1951. – V.193(1). – P.265–275
104. Liu, Y., Wang, Y., Xu, S., Tang, X., Zhao, J., Yu, C., He, G., Xu, H., Wang, S., Tang, Y., Fu, C., Ma, Y., Zhou, G. (2019) Efficient genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Lemna aequinoctialis*. // *Plant Biotechnology Journal* 17: 2143-2152.
105. Martinez C.A., Guilietti A.M., Talou R. Research advances in plant-made flavivirus antigens // *Biotechnology Advances*. – 2012. – V.30 – I.6. – P.493-505 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.004>

106. Magnusson I., Bornmann C.H. Anatomical observation on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immature zygotic embryos of *Triticum aestivum* // *Physiologia Plantarum*. – 1985. – Vol. 63. – P. 137-145.
107. Mason H.S., Lam D. M., Arntzen C. J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1992. – V.89 – P.11745–11749.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.1174>
108. Mason H. S., Ball J. M., Shi J. J., Jiang X., Estes M. K., Arntzen C. J. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1996. – V.93. – P.5335–5340. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.533>
109. Mengwasser K.E., Bush L.A., Shih P., Cantwell A.M., Di Cera E. Hirudin binding reveals key determinants of thrombin allostery // *J. Biol. Chem.* 2005. – V.280. – I.29 – P.26997–27003
<https://doi.org/10.1074/jbc.M502678200>
110. Mett V., Musiychuk K., Hong B., Horsey A., Ugulava N., Shoji Y., Patricia D.L.R., Palmer G.A., Rabindran S., Streatfield S.J., Boyers A., Russell M., Mann A., Lambkin R., Oxford J.S., Schild G.C., Yusibov V. A plant-produced influenza subunit vaccine protects ferrets against virus challenge // *Influenza and Other Respiratory Viruses Journal*. – 2008. – Vol. 2(1). – P. 33-40.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00037.x>
111. Meza TJ, Stangeland B, Mercy IS, Skårn M, Nymoen DA, Berg A, Butenko MA, Håkelién A-M, Haslekås C, Meza-Zepeda LA et al. / Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing // *Nucleic Acids Research*. – 2002. Vol.30(20). – P. 4556–4566
<https://doi.org/10.1093/nar/gkf568>

112. Montagu Van M. & Zambryski P. *Agrobacterium and Ti Plasmids* // Reference Module in Life Sciences. – 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06024-6>
113. Moravec T., Schmidt M. A., Herman E. M., Woodford-Thomas T. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine // *Vaccine*. – 2007. – V.25. – I.9. – P.1647-1657.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.010>
114. Müller C., Mescke K., Liebig S., Mahfoud H., Lemke S., Hildebrandt J.P. More than just one: multiplicity of Hirudins and Hirudin-like Factors in the Medicinal Leech *Hirudo medicinalis*. // *Mol. Genet. Genomics*. – 2016. – V.291(1). – P.227–240.
115. Narayanan K., Walenga J.M., Liang M.D., Fareed J. Recombinant hirudin--initial observations in reconstructive microsurgery // *Haemostasis*. – 1991. – V.21. – P.168–171. <https://doi.org/10.1159/000216280>
116. Oldach K.H., Morgenstern A., Rother S., Girgi M., O’Kennedy M., Lorz H. Efficient in vitro plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. // *Plant Cell Reports*. – 2001. – Vol. 20. – P. 416-421.
117. Oszvald M., Kang T.J., Tomoskozi S., Tamas C., Tamas L., Kim T.G., Yang M.S. Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic b subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin in rice endosperm // *Molecular Biotechnology*. 2007. – V.35. – P.215–223. <https://doi.org/10.1007/BF02686007>
118. Parmenter D.L., Boothe J.G., van Rooijen G.J., Yeung E.C., Moloney M.M. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning // *Plant Mol. Biol.* – 1995. – V.29(6). – P.1167–1180.
<https://doi.org/10.1007/BF00020460>

119. Pham T.L.T., Nguyen H.A., Pham T.H., Nguyen T.H., Le H.H. Improvement of transformation procedure into duckweed (WOLFFIA SP.) via *Agrobacterium tumefaciens* // Tạp chí Công nghệ Sinh học (in Vietnam) – 2010. – Vol 8(1). – P. 53-60.
120. Rader R.A., Langer E.S. Biopharmaceutical manufacturing: historical and future trends in titers, yields, and efficiency in commercial-scale bioprocessing // J. BioProcess, – 2015. – V.13(4). –P.47–54.
<http://dx.doi.org/10.12665/J134.Langer>
121. Rydell N., Sjöholm I. Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant // Vaccine. – 2004. – V.22(9-10). – P.1265-1274 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.034>
122. Radzio R., Kuck U. Efficient synthesis of the blood-coagulation inhibitor hirudin in the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* // Appl Microbiol Biotechnol. – 1997. – V.48. – I.1. – P.58–65.
123. Rani D. & Vimolmangkang S. In: Kole, C., Chaurasia, A., Hefferon, K.L., Panigrahi, J. (eds)/ Production of Recombinant Proteins Using Plant Cell Suspension Cultures and Bioreactor Engineering: A Short Review // Applications of Plant Molecular Farming. Concepts and Strategies in Plant Sciences. Springer, Singapore. – 2024. – P.141-161
https://doi.org/10.1007/978-981-97-0176-6_6
124. Richter L. J., Thanavala Y., Arntzen C. J. and Mason H. S. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization // Nat. Biotechnol. 2000. – V.18. –P.1167–1171. doi: 10.1038/81153
125. Rival S., Wisniewski J.P., Langlais A., Kaplan H., Freyssinet G., Vancanneyt G., Vunsh R., Perl A. Edelman M. Spirodela (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study aprotinin // Transgenic Research. – 2008. – Vol.17 – P. 503–513. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9123-x>

126. Roche J., Love J., Guo Q., Song J., Cao M., Fraser K., Huege J., Jones C., Novák O., Turnbull M.H., Jameson P.E. Metabolic changes and associated cytokinin signals in response to nitrate assimilation in roots and shoots of *Lolium perenne* // *Physiol. Plant.* – 2016. – V.156. – P.497–511
127. Rosales-Mendoza S., Márquez-Escobar V.A., González-Ortega O., Nieto-Gómez R., Arévalo-Villalobos J.I. What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? // *Vaccines.* – 2020. – V.8. – P.183. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020183>
128. Rosenfeld S.A., Nadeau D., Tirado J., Hollis G.F., Knabb R.M., Jia S. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* / S.A. Rosenfeld, // *Protein Expr Purif.* – 1996. – V.8. – I.4. – P.476–482. <https://doi.org/10.1006/prep.1996.0127>
129. Rothwell G.W., van Atta M.R., Ballard H.E., Stockey R.A. Molecular phylogenetic relationships among Lemnaceae and Araceae using the chloroplast trnL-trnF intergenic spacer // *Mol. Phyl. Evol.* – 2004. – V.30. – P.378-385.
130. Sambrook J., Fritsch E. R. & T. Maniatis *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989.
131. Santi L., Batchelor L., Huang Z., Hjelm B., Kilbourne J., Arntzen C. J., Chen Q., Mason H. S. An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles // *Vaccine.* – 2008. – V.26. – I.15. – P.1846-1854. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.053>
132. Sciutto E., Fragoso G., Manoutcharian K., Gevorkian G., RosasSalgado G., Hernández-Gonzalez M., Herrera-Estrella L., Cabrera-Ponce J., López-Casillas F., González-Bonilla C., Santiago-Machuca A., Ruíz-Pérez F., Sánchez J., Goldbaum F., Aluja A., Larralde C. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis // *Arch. Med. Res.* – 2002. – V.33 – I.4. – P.371-378.

[https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00376-4)

133. Schillberg S., Raven N., Spiegel S., Rasche S., Buntru M. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins // *Front. Plant Sci.* – 2019. – V.10. – P.720.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720>
134. Schillberg S., Finnern R. Plant molecular farming for the production of valuable proteins - Critical evaluation of achievements and future challenges // *J Plant Physiol.* – 2021. – V.258-259
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153359>
135. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Can J Bot.* – 1972. – Vol. 50. – P. 199–204.
136. Schwestka J., Tschofen M., Vogt S., Marcel S., Grillari J., Raith M., Swoboda I., Stoger E. Plant-derived protein bodies as delivery vehicles for recombinant proteins into mammalian cells // *Biotechnology and Bioengineering.* 2020. – V.117. – P.1037–1047. <https://doi.org/10.1002/bit.27273>
137. Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E., et al. A 3,387 bp 5'-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice. // *Transgenic Res.* – 2012. – V.21. – P.485– 498 <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9547-1>
138. Sijmons P.C., Dekker B.M., Schrammeijer B., Verwoerd T.C., van den Elzen P.J., Hoekema A. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants // *Biotechnology.* – 1990. – V.8 – I.3. – P.217–221.
<https://doi.org/10.1038/nbt0390- 217>
139. Sharifi T. M., Solouki M., Tohidfar M., Sadeghizadeh M. Expression of human granulocyte-colony stimulating factor (hGCSF) gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*) // *Austr. J. Crop Sci.* V.6. – P.135–140.

140. Sharma, A. K. and Sharma, M. K. /Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities // *Biotechnol. Adv.* – 2009. –V.27. – P.811–832. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.004
141. Shvedova A.N., Khvatkov P. A. and Dolgov S. V. Optimization of Factors Affecting the Efficiency of Agrobacterium-Mediated Transformation of *Wolffia arrhiza* // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2023 V.59(9). – P.1177–1182
142. Sohrab S. S., Husen A., Suhail M., Azhar E. I. Edible Vaccine: Current Status and Future Perspectives // *Current Drug Metabolism.* – 2017. – V.18. – I.9. – P.831 – 841 [10.2174/1389200218666170711121810](https://doi.org/10.2174/1389200218666170711121810)
143. Shingo Nagaya, Ko Kato, Yuka Ninomiya, Rie Horie, Masami Sekine, Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo / Expression of Randomly Integrated Single Complete Copy Transgenes Does not Vary in *Arabidopsis thaliana* // *Plant and Cell Physiology.* – 2005. – V.46(3). – P.438–444 <https://doi.org/10.1093/pcp/pci039>
144. Sree K.S., Bog M., Appenroth K.J. Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture* – 2016. – V.28 – I.5. – P.291-302 <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-01-038>
145. Srinivas L., Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Revathi C. J., Bapat V. A. Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) // *Plant Biotechnology Reports.* – 2008. – V.2. – P.1–6. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0041-z>
146. Stiff C.M., Kilian A., Zhou H., Kudrna D., Kleinhofs A. Stable transformation of barley callus using biolistic particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (bar) gene // *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1995. – Vol. 40. – P. 243-248.
147. Stertman L., Lundgren E., Sjöholm I. Starch microparticles as a vaccine adjuvant: Only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response // *Vaccine.* – 2006. – V.24(17). – P.3661-3668.

148. Stone S.R., Hofsteenge J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin // *Biochemistry*. 1986. – V.25. – I.16. – P.4622–4628. doi:[10.1021/bi00105a005](https://doi.org/10.1021/bi00105a005)
149. Stockey R.A., Homan G.L., Rothwell G.W. The fossil *Limnobiophyllum scutatum*: resolving the phylogeny of Lemnaceae // *Am. J. Bot.* – 1997. – V. 84. – P.355—368
150. Strasser R., Altmann F., Mach L., Glössl J., Steinkellner H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose // 2004. – *FEBS Lett* 561(1–3). P.132–136
151. Strasser R., Stadlmann J., Schähs M., Stiegler G., Quendler H., Mach L., Glössl J., Weterings K., Pabst M., Steinkellner H. Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure // *Plant Biotechnol J.* – 2008. – V.6(4). – P.392–402
152. Patent US20050060776A1, ICI C12P21/02, C12N15/09, C12N9/00, C12N5/10, C12P21/08, C12N15/82, C07K14/56. Expression of biologically active polypeptides in duckweed / A.-M. Stomp, D. Lynn, J. Gasdaska; original assignee Biorex Inc. – № US10/873,846; priority date 31.07.00; publication date 17.03.05.
153. Patent US6040498A, ICI A01H4/00, C12N15/84, C12N15/82, A01H13/00. Genetically engineered duckweed / A.-M. Stomp, N. Rajbhandary; original assignee North Caroline State University. – № US09/132,536; priority date 11.08.98; publication date 21.03.00.
154. Patent US7176024B2, ICI C1M1/100, C12N5/00. Bioreactor for growing biological materials supported on a liquid surface / R.E. Branson, K. Everett, B. Hester, T.B. Vickers; original assignee Biorex Inc. – № US10/845,914; priority date 30.05.03; publication date 13.02.07.
155. Sun Y., Cheng J.J., Himmel M.E., Skory C.D., Adney W.S., Thomas S.R., Tisserat B., Nishimura Y., Yamamoto Y.T. Expression and characterization of

- Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627 // *Biores Technol.* – 2007. – V. 98. – P.2866–2872
156. Sysuev B.B., Pokrovskaya J.S. Recombinant microorganisms and cell culture in the technology of protein preparations // *Dev. Registr. Drugs.* – 2015. – V.4. – P.96–109.
157. Tabar M. S., Solouki M., Tohidfar M., Sadeghizadeh M. Expression of human granulocyte-colony stimulating factor ('hGCSF') gene in tobacco ('*Nicotiana tabacum*') // *Australian Journal of Crop Science.* – 2012. – V.6(1) – P.135-140.
158. Tabar M. S., Habashi A.A., Rajabi Memari H. Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) expression in plastids of *Lactuca sativa* // *Iran Biomed Journal.* – 2013. – V.17(3). – P.158-64. doi: [10.6091/ibj.1180.2013](https://doi.org/10.6091/ibj.1180.2013)
159. Tacket C., Mason H., Losonsky G. et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. // *Nat Med.* – 1998. – V.4. – P.607–609. <https://doi.org/10.1038/nm0598-607>
160. Tacket, C. Garden-variety vaccines: antigens derived from transgenic plants // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2004. – V.3(5) – P.529-531. <https://doi.org/10.1586/14760584.3.5.529>
161. Takacs K., Vegh R., Mednyanszky Z., Haddad J., Allaf K., et al. New insights into duckweed as an alternative source of food and feed: Key components and potential technological solutions to increase their digestibility and bioaccessibility // *Applied Sciences.* 2025. – V.15(884).
162. Takayama, S. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques // In: Y. P. S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: Hightech and micropropagation.* - Springer-Verlag, Berlin. – 1991. – Vol. 17. – P. 1–46.
163. Takahashi S., Matsubara K., Yamagata H., Morimoto T. Micropropagation of virus free bulblets of *Lilium longiflorum* by tank culture // *Acta Hort.* – 1992. – Vol. 319. – P. 83–88.

164. Tan X., Chen S., Fang Y., Liu P., Hu Z., Jin Y., Yi Z., He K., Li X., Zhao L., et al. Rapid and Highly Efficient Genetic Transformation and Application of Interleukin-17B Expressed in Duckweed as Mucosal Vaccine Adjuvant. // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12(12). – P.1881. <https://doi.org/10.3390/biom12121881>
165. Tippery N.P., Les D. H. and Crawford D. J. Evaluation of phylogenetic relationships in Lemnaceae using nuclear ribosomal data // *Plant Biol.* – 2015. – V.17. – I.1. – P.50-58.
166. Thorne R. T. Classification and geography of the flowering plants. *Botanical Review*. 1992. – V.58. – P.225-348.
167. Vacchelli E., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines // *Oncoimmunology*. 2013. – V.2 – I.7. <https://doi.org/10.4161/onci.24850>
168. Vunsh R., Li J., Hanania U., Edelman M., Flaishman M., Perl A., Wisniewski J.P., Freyssinet G. High expression of transgene protein in *Spirodela* // *Plant Cell Rep.* – 2007. Vol. – 26. – P. 1511-1519. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0361-4>
169. Walmsley A.M., Arntzen C.J. Plants for delivery of edible vaccines // *Curr Opin Biotechnol.* – 2000. – Vol.11. – P.126–129. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00070-7)
170. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks // *Nat Biotechnol.* – 2018. – V.36. – I.12. – P.1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
171. Wayne A.P. and Thorne, R.F. – 1984. The genus *Wolffia* (Lemnaceae) in California." *Madroño* 31(3), P.171-79.
172. Wei C., Hu Z., Wang S., Tan X., Jin Y., Yi Z., He K., Zhao L., Chu Z., Fang Y., Chen S., Liu P., Zhao H. An endogenous promoter LpSUT2 discovered in duckweed: a promising transgenic tool for plants // *Front Plant Sci.* – 2024. – Vol.15 <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1368284>

173. Wolff P. Les lentilles d'eau de l'Alsace. – Bull. Assoc //Amis Jard.bot. Col de Saveme, 1992. – P.25–33.
174. Yang G.-L., Feng D., Liu Y.-T., Lv S.-M., Zheng M.-M., Tan A.-J. Research Progress of a Potential Bioreactor: Duckweed // Biomolecules. – 2021. – Vol.11. – P. 93. <https://doi.org/10.3390/biom11010093>
175. Yamamoto Y.T., Rajbhandari N., Lin X.H., Bergmann B.A., Nishimura Y., Stomp A.M. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor* // In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant. – 2001. – Vol. 37(3). – P. 349-353.
<https://doi.org/10.1007/s11627-001-0062-6>
176. Yen C.H., Yang C.K., Chen I.C., Lin Y.S., Lin C.S., Chu S., Tu C.F. Expression of recombinant Hirudin in transgenic mice milk driven by the goat beta-casein promoter // Biotechnol J. – 2008. – V.3. – I.8. – P.1067–1077.
177. Yusibov V., Mett V., Davidson C., Musiychuk K., Gilliam S., Farese A., Vittie T.M., Mann D. Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus // Vaccine. – 2005. – Vol. 23. – P. 2261-2265.
178. Yusibov V., Rabindran S. Recent progress in the development of plant-derived vaccines // Expert Reviews of Vaccines. – 2008. – V.7. – P.1173-1183
179. Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., et al. Trial Watch: immunostimulatory cytokines. Oncoimmunology. – 2013. – V.2
180. Zhao H., Appenroth K. J., Landesman L., Salmean A. A. and Lam E. Duckweed rising at Chengdu: Summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and Research // Plant Mol. Biol. – 2012. – V.78. – P.627-632
181. Zhang X., Buehner N. A., Hutson A. M., Estes M. K., Mason H. S. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein // Plant. Biotechnol. J. – 2006. – V.4. – I.4. – P.419-432.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00191.x>

182. Ziegler P., Adelman K., Zimmer S., Schmidt C., Appenroth K-J. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) – the most rapidly growing higher plants // *Plant Biology*. – 2015. – V.17. – I.1. – P.33–41
183. Zimran A., Brill-Almon E., Chertkoff R., Petakov M., Blanco-Favela F., Muñoz E.T., Solorio-Meza S.E., Amato D., Duran G., Giona F. et al. Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease // *Blood* – 2011. – V.118, P.5767–5773. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366955>
184. Zimran A., Wajnrajch M., Hernandez B., Pastores GM Taliglucerase alfa: safety and efficacy across 6 clinical studies in adults and children with Gaucher disease // *Orphanet J Rare Dis*. // 2018. – V.13(1). – P.36. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0776-8>
185. Ziv M. Bioreactor technology for plant micropropagation // *Horticultural Reviews*. – 1999. – Vol. 24. – P. 1–30.
186. Ziv M. Simple bioreactors for mass propagation of // *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. – 2005. – P. 79-93.
187. [Plant-based Biologics Market Size 2026 | Revised in a New Report \(researchdive.com\)](#)
188. <http://www.kazusa.or.jp/codon>