

УДК 57.084.1+578.74

СИНТЕЗ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ПАПИЛЛОМАВИРУСА L1 АНОГЕНИТАЛЬНОГО ТИПА ВПЧ6 В РАСТИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЕ НА ОСНОВЕ ПЛОДОВ ТОМАТА

© 2021 г. Н. И. Рекославская^{1,2,*}, член-корреспондент РАН Р. К. Саляев¹, А. С. Столбиков¹

Поступило 05.12.2020 г.

После доработки 29.01.2021 г.

Принято к публикации 03.02.2021 г.

Белок оболочки папилломавируса аногенитального типа ВПЧ6 L1 синтезировали в растительной экспрессионной системе на основе плодов томата. Содержание ВПЧ6 L1 достигало 380 мкг на мг общего растворимого белка, который был представлен единичной полосой в 56 кДа при ДСН-электрофорезе. Перорально введенный в мышей препарат из плодов томата, трансгенного по ВПЧ6 L1, вызывал высокоэффективный синтез антител с высоким титром. При анализе сыворотки крови иммунизированных мышей было обнаружено перекрестное взаимодействие антител к белку ВПЧ6 L1 с антигенными белками ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1, что создает возможность перспективы создания вакцины более широкого спектра действия против опасных аногенитальных папилломатозов и цервикального рака.

Ключевые слова: аногенитальные папилломатозы, ВПЧ6 L1, пероральная иммунизация мышей, перекрестное взаимодействие антител к белку ВПЧ6 L1 с антигенными белками ВПЧ L1 типов 16, 18, 31 и 45

DOI: 10.31857/S2686738921030124

Распространение аногенитальных папилломавирусов в природе достаточно велико [1]. Ежегодный прирост количества заболеваний, характеризующихся разрастаниями у теплокровных по типу остроконечных кондилом *Condyloma acuminata*, вызываемых аногенитальными типами ВПЧ6 и ВПЧ11, достигает 1 млн случаев в тех странах, где осуществляется контроль за этим заболеванием [2], при этом в число заболеваний включаются не только аногенитальные кондиломы и бородавки, но также карциномы легких, миндалин и рак гортани [3]. Кроме того, известно [4], что аногенитальные типы папилломавирусов ВПЧ6 и ВПЧ11 ответственны за появление и развитие неканцерогенных (условно) рецидивирующих респираторных папилломатозов верхних дыхательных путей.

Вследствие возвратного характера этого заболевания пациенты вынуждены подвергаться многократному хирургическому вмешательству (от 40 до 150 раз) в течение своей жизни [5–7]. Полагают,

что возвратный характер папилломатозов обусловлен латентным состоянием вируса без клинических признаков заболевания, не распознаваемого иммунной системой хозяина вследствие низкой копийности и малого содержания антигенов, но способным проявляться при иммуносупрессии, под действием внешних факторов (УФ радиация, раздражение и стрессы) [8]. Латентность ВПЧ поддерживается увеличением содержания транскриптов “раннего” гена ВПЧ E1, ответственного за выживание и сохранность эписомальных геномов папилломавирусов в условиях ограниченной репликации [9].

Широкое распространение папилломатозов требует и достаточно крупных финансовых затрат. В США затраты на лечение аногенитальных папилломатозов составляют 220 млн долларов ежегодно [10], на лечение рецидивирующих респираторных папилломатозов тратится свыше 100 млн долларов [5, 6]. В странах Западной Европы, в частности, в Англии ежегодно затрачивается 16.8 млн фунтов стерлингов для лечения этих заболеваний [11].

Несмотря на то что ВПЧ6 L1 и ВПЧ11 L1 входят в состав таких вакцин, как квадριвалентный Гардасил и 9-валентный нона-Гардасил, желательна разработка специальных вакцин против аногенитальных папилломатозов.

¹ ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия

² ФГБНУ Иркутский научный центр Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия

*e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

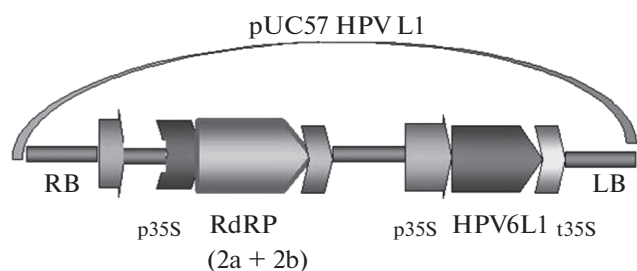


Рис. 1. Схема генетической конструкции для синтеза ВПЧ6 L1.

Гардасил послужил неплохим профилактическим препаратом, но только для предотвращения цервикального рака. Другие типы папилломатозов: рак головы и шеи [12], аногенитальные папилломатозы, рецидивирующие респираторные папилломатозы [13–15] оказались вне сферы действия этих вакцин и за последние 10 лет заболеваемость увеличилась примерно в 10 раз согласно статистике Международного агентства по изучению рака IARC, GLOBOCAN, WHO [16, 17]. Так как при этом все же у пациентов обнаруживались специфические антитела к типам ВПЧ6 и 11 (наряду с 16 и 18 типами), предположили, что одной из причин роста заболеваний является нарушение иммуногенеза Т лимфоцитов [2, 4, 18].

В задачу настоящей работы входило использование растительной экспрессионной системы на основе плодов трансгенного по гену *hrv6 L1* томата для синтеза антигенного белка ВПЧ6 L1 с целью рассмотрения перспективы создания вакцины достаточно широкого действия против аногенитальных и других опасных папилломатозов.

На рис. 1 приведена схема генетической конструкции для синтеза антигенного белка ВПЧ6 L1 в растительной экспрессионной системе, разработанной нами ранее [19].

Центральным регуляторным элементом данной конструкции является ген *RdRP*, кодирующий РНК зависимую РНК полимеразу вируса мозаики огурца *CMV*, состоящий из двух фрагментов: РНК 2a (собственно полимеразу) и матрицу суперсупрессора РНК интерференции, кодирующую белок антисайленсер *CMV 2b* [20]. Наличие собственного суперсупрессора РНК интерференции белка *CMV 2b*, кодируемого в цис-ориентации, позволяет накапливать РНК реплисомы в количестве до 200 на клетку. При этом значительно усиливается экспрессионная эффективность разработанной нами конструкции, а реплисомы способны ассамблироваться в димеры, тримеры, пентамеры и, наконец, в разнообразные полимеры (полигоны, сотовые структуры, структуры в виде пучков димеров и др.), в которых нет доступных сайтов для действия РНКаз [21].

Генетическую трансформацию плодов томата проводили по ранее опубликованному методу [19]. Для этого на полевой делянке СИФИБР СО РАН в поликарбонатной теплице выращивали растения томата розовоплодного гибрида F1 (основа томата сорта Абаканский розовый) до достижения размера зеленых плодов 200–400 г с содержанием сырого протеина до 6%.

Генетические конструкции, клонируемые в *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, хранились при -62°C в криоконсервации (среда LB с 30% глицерином). После посева на агаровую среду LB с 50 мг/л ампицилина клетки росли в течение 2 сут, а затем бактериальный газон суспендировали стерильным раствором 1% ацетосирингона (Sigma, USA) в 5% глюкозе. Эту бактериальную суспензию использовали для трансформации зеленых плодов.

Для наработки вакцинного материала с целью последующей вакцинации мышей в доклинических испытаниях использовали около 50 кг зеленых плодов. Плоды трансформировали в ламинар-боксе в стерильных условиях. Для этого одноразовым шприцем вводили по 10–20 мкл бактериальной суспензии в локулюсы (камеры) в нижней части плода, отверстия заклеивали кусочком медицинского лейкопластыря, а затем плоды раскладывали на полки бытового холодильника и содержали в темноте при $6\text{--}8^{\circ}\text{C}$. Трансформация осуществлялась в течение 18 сут (и более, см. рис. 2). При трансформации создавали стандартные условия, что и отразилось на примерно одинаковом выходе синтезированного антигенного белка (25–33% ОРБ). За период 18 сут плоды томата краснели, но были еще достаточно плотными, поэтому для их гомогенизации использовали электрический измельчитель (фирма Redmond). Гомогенизированный вакцинный материал распределяли в пищевые пластиковые контейнеры, замораживали и до момента анализа хранили при температуре -24°C в бытовом морозильнике. Перед анализом гомогенаты размораживали при комнатной температуре, затем осветляли центрифугированием (14000 g в течение 15 мин при 4°C). Супернатант использовали для электрофореза, Вестерн-блот-гибридизации и ИФА. Антигенные белки L1 типов ВПЧ16, 18, 31 и 45 получали аналогичным образом.

Для ДСН электрофореза с последующей Вестерн-блот-гибридизацией на пластинки SDS PhastGel (ПААГ градиент 8–15%) наносили по 0.5 мкл образцов гомогенатов трансформированных плодов. В качестве контролей на пластинки наносили воду (2 мкл), гомогенаты нетрансформированных плодов (2 мкл), а также растворы HPV16 L1 (SantaCruz, USA) 1.5 мкг и 2.5 мкг в 6 мкл (максимально допустимый объем нанесения) и подвергали электрофорезу в приборе

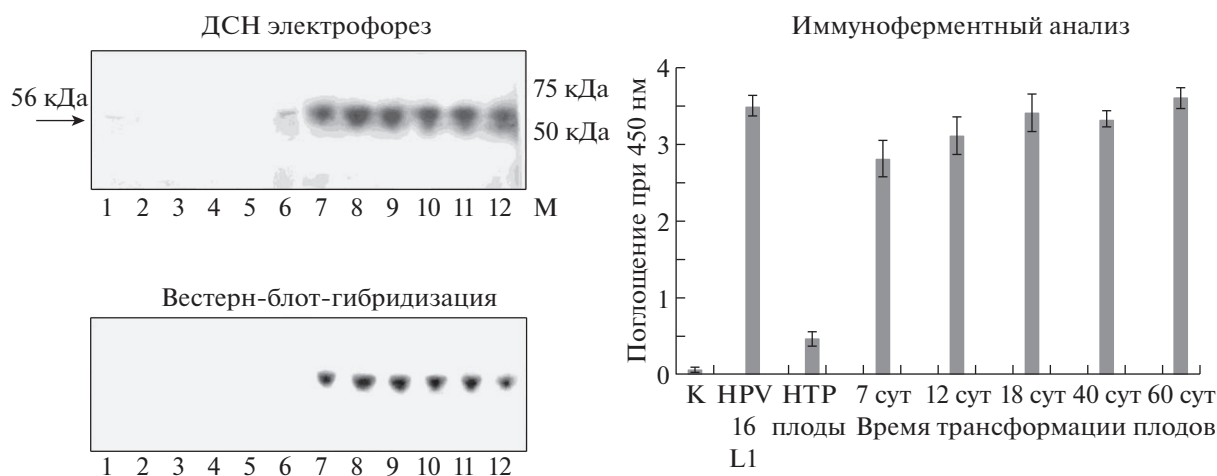


Рис. 2. ДСН электрофорез (слева сверху) и Вестерн-блот-гибридизация (слева внизу) антигенного белка ВПЧ6 L1, полученного в растительной экспрессионной системе на основе плодов томата через 18 сут после трансформации и ИФА динамики накопления белка ВПЧ6 L1 в течение 7, 12, 18, 40 и 60 сут после трансформации (в правой части рисунка). Для проявления в Вестерн-блот-гибридизации использовали в качестве первичных антител сыворотку крови мышей, предварительно вакцинированных ВПЧ6 L1. Использованы вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой, субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP) и активатор окисления нитротетразолия синий (NBT). В левой части рисунка обозначения: № 1 и № 6 – 1.5 и 2.5 мкг HPV16 L1 (SantaCruz, США), № 2 и № 5 – 5 мкл воды, № 3 и № 4 – 5 мкл гомогенатов контрольных плодов, № 7–12 представляют образцы по 0.5 мкл индивидуально трансформированных геном *hpv6* L1 плодов. М – показано положение цветных полос стандартных белков 50 кДа (пурпурная окраска) и 75 кДа (желтая окраска) набора Full Range Rainbow Recombinant protein molecular weight markers (Amersham). 56 кДа – молекулярная масса стандартного белка HPV16 L1 (SantaCruz).

Обозначения на графике в правой части рисунка: К – “пустой” отрицательный контроль, HPV16 L1 – положительный контроль, стандарт 200 нг HPV16 L1 (SantaCruz, США), НТП плоды – нетрансформированные плоды. Используются в качестве первичных антител сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1, вторичные антитела – конъюгаты мышиных IgG с пероксидазой хрена (Abcam, UK), субстрат – ортофенилендиамин (SigmaFAST™ OPD). В барах представлены средние квадратичные ошибки (N = 30).

PhastSystem (Amersham, UK), используя программное обеспечение прибора для разделения белков (программа № 3).

Для получения антител к ВПЧ6 L1 мышей (беспородные самки в возрасте 6 мес, полученные из вивария Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований, г. Ангарск, работы с животными одобрены на заседании биоэтического совета СИФИБР СО РАН протокол № 9 от 30.10.2019) перорально вакцинировали вакцинным материалом плодов томата из расчета 500 мг антигенного белка ВПЧ6 L1 на мышью трижды с интервалами: 1, 2 и 3 мес (итого 6 мес вакцинации). Всего в эксперименте мышью содержали 10 мес от момента первой вакцинации на полном рационе, затем у них брали кровь и определяли наличие антител в сыворотке крови по ранее опубликованному методу [22]. При содержании мышью соблюдали стандартные условия, прописанные в ГОСТ 33215–2014, 33216–2014.

Для оценки антител, получаемых в сыворотке крови вакцинированных мышью, была проведена значительная подготовительная работа. (Антитела к HPV6 L1 зарубежными фирмами в Россию не поставляются.)

Эффективность и титр полученных антител в сыворотке крови мышью определяли косвенным путем, анализируя сыворотку крови мышью, вакцинированных ВПЧ16 L1, ВПЧ6 L1 и сравнивая титр (эффективность) с титром коммерческих антител на HPV16 L1 фирмы SantaCruz (США). Для их сравнительной оценки использовали следующие антитела: мышиное моноклональное антитело на HPV16 L1 (CAMVIR-1), sc-47699; мышинное моноклональное антитело на HPV16 L1 (MD2H11), sc-65713; козьи поликлональные антитела на HPV16 L1 (vc-13), sc-18052. Оказалось, что во всех случаях антитела из сыворотки крови мышью, нами вакцинированных ВПЧ16 L1, либо ВПЧ6 L1, были примерно на 3 порядка более эффективны, чем любые коммерческие антитела фирмы SantaCruz. Причиной, по-видимому, является более высокая avidность (от англ. avidity – жадность, цепкость связывания) антител, получаемых нами в сыворотке крови вакцинированных мышью. Поэтому мы сочли возможным использовать антитела сыворотки крови вакцинированных мышью в анализах. Аналогичный подход к получению сывороток крови мышью, содержащих антитела на определенный тип ВПЧ, хорошо известен в литературе и широко используется в аналитической работе [23].

Таблица 1. Содержание антигенного белка ВПЧ6 L1 в супернатантах гомогенатов сырых плодов томата, трансгенного по гену hrv6 L1

Номер плода	Содержание ВПЧ6 L1, мкг/мг ОРБ*
1	230.2 ± 16.1
2	248.3 ± 7.5
3	333.7 ± 10.0
4	317.7 ± 9.5
5	372.5 ± 11.2
6	324.2 ± 9.7
7	361.9 ± 10.9
8	382.0 ± 11.5
9	256.30 ± 7.7
10	275.7 ± 9.3
11	335.8 ± 10.1
12	333.1 ± 10.0
13	299.0 ± 9.0
14	286.2 ± 8.6
15	261.9 ± 7.9
16	306.7 ± 9.2
Контроль	0.0 ± 0.0

* Количество ВПЧ6 L1 определяли в пересчете на эквивалент стандартного белка HPV16 L1 (SantaCruz, США).

На рис. 2 представлены результаты электрофоретического разделения (слева вверху) экстрактов плодов томата, трансгенного по ВПЧ6 L1, Вестерн-блот-гибридизация с сывороткой крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1 (слева внизу). Динамика накопления белка ВПЧ6 L1 в плодах томата в течение 7, 12, 18, 40, 60 сут после трансформации представлена в правой части рис. 2.

Как можно видеть из рис. 2 (слева), на ДСН электрофореграмме экстрактов плодов томата (по 5 мкл), трансформированных геном hrv6 L1, присутствуют только пятна (пятна под № 7–12), совпадающие по Rf с подвижностью стандартного белка оболочки папилломавируса L1 в 56 кДа (HPV type 16 L1 antigen protein, full length, recombinant from *S.cerevisiae*) (SantaCruz, США), который нанесен на пластинку SDS PhastGel в количестве 1.5 мкг (пятно № 1) и 2.5 мкг (максимально возможное количество в 6 мкл, пятно № 6). Других пятен, соответствующих по подвижности маркерному белку HPV16 L1 фирмы SantaCruz, на пластинке нет. В качестве контролей представлены нанесение 5 мкл воды (№№ 2 и 5) и экстракт нетрансформированных плодов по 5 мкл (№№ 3 и 4), в которых также не обнаружено каких-либо пятен. При нативном электрофорезе обнаруживали только одну полосу соответствующей подвижности (Rf 56 кДа), других высокомолекулярных соединений, реагирующих с антителами, не

было обнаружено. Для соотнесения с маркерными стандартными белками на рис. 2 (слева, буква М) указаны Rf двух белков (50 и 75 кДа) из линейки цветных белковых стандартов фирмы Amersham, предназначенных для визуализации хроматографирования на пластинках SDS Phast-Gel (“Full Range Rainbow Recombinant protein molecular weight markers” (RPN 800)). Проявление зон гибридизации в Вестерн блоттинге осуществляли с помощью антител, полученных в сыворотке крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1 по методу, опубликованному ранее [22].

При изучении динамики синтеза ВПЧ6 L1 (рис. 2, справа) методом ИФА обнаружено, что уже через 7 сут в плодах накапливается значительное количество ВПЧ6 L1, которое возрастает к 18 сут трансформации и при дальнейшей инкубации поддерживается на том же примерно уровне. В качестве контроля были взяты экстракты нетрансформированных плодов томата, в которых не было обнаружено присутствия антигенного белка ВПЧ6 L1. Положительным контролем послужил маркерный стандартный белок HPV16 L1 (SantaCruz, США) в количестве 25 мкг в лунку планшета. Во всех случаях в качестве первичных антител использовали сыворотку крови мышей,

В табл. 1 приведен анализ выборки из 16 плодов (массой около 200 г), трансформированных геном hrv6 L1 в течение 18 сут. Методом ИФА [22] показано, что в плодах накапливалось значительное количество антигенного белка ВПЧ6 L1, достигающее значений 25–30% общего растворимого белка (ОРБ). В контроле (нетрансформированные плоды) антигенный белок, реагирующий с антителами на ВПЧ6 L1, не был найден.

В последнее время значительное внимание уделяется перекрестным взаимодействиям антигенных белков оболочки папилломавирусов различных типов, так как это создает перспективу возможности получения профилактической вакцины более широкого спектра действия, включая высококанцерогенные и аногенитальные типы и, вероятно, меньшей стоимости при ее изготовлении за счет уменьшения числа ее компонентов.

В настоящей работе методом Вестерн-блот-гибридизации белков ВПЧ6 L1, ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 с антителами сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1, изучали перекрестное взаимодействие между этими типами (рис. 3). Для этого на нитроцеллюлозную мембрану Hybond™-С EXTRA (оптимизированную для гибридизации белков) (Amersham Biosciences, UK) нанесли однократно по 5 мкл осветленных гомогенатов соответствующих трансформированных плодов, высушивали на воздухе в течение дня, блокировку осуществляли 3% раствором БСА в течение суток

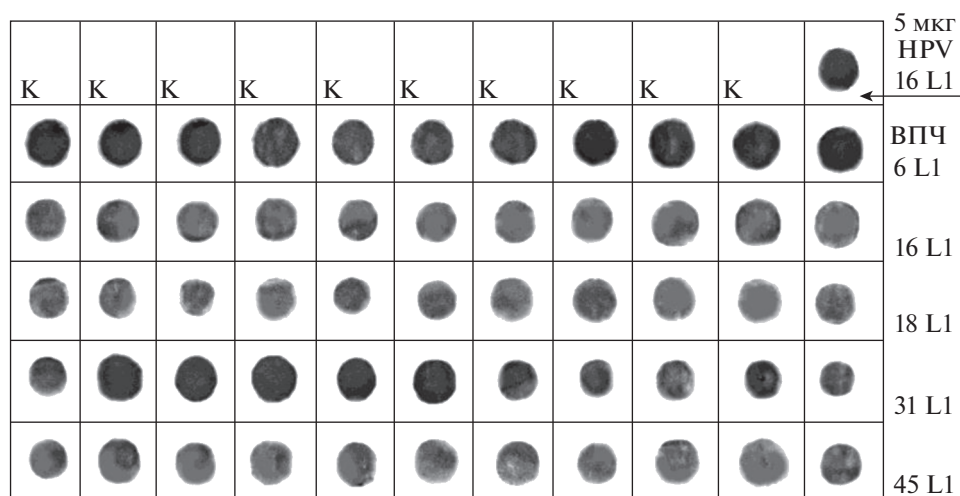


Рис. 3. Вестерн-блот-гибридизация и перекрестное взаимодействие антигенных белков ВПЧ6 L1, ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 с антителами из сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1. Используются вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой, субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP) и активатор окисления нитротетразолий синий (NBT). К – в качестве отрицательного контроля гомогенаты нетрансформированных плодов. HPV16 L1 – положительный контроль, в пятно нанесено 5 мкг раствора стандартного белка HPV16 L1 (SantaCruz, США). Осветленные гомогенаты антигенных белков ВПЧ6 L1, ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 нанесены в объеме 5 мкл в пятно однократно.

при 6–8°C, на следующий день проводили гибридизацию с антителами сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1 по методу, опубликованному [22].

На рис. 3 можно видеть, что все типы белков L1 (6, 16, 18, 31 и 45) были способны достаточно хорошо гибридизоваться с антителами сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1. В контроле (нетрансформированные плоды) пятен гибридизации не обнаружено.

Таким образом, оказалось, что разрабатываемая нами кандидатная вакцина против аногенитальных типов папилломавирусов может оказаться перспективной для разработки вакцины с использованием в качестве профилактической с целью индукции синтеза антител широкого спектра, узнающих антигены L1 папилломавирусов также и высокоонкогенных типов.

Молекулярный механизм перекрестного праймирования “наивных” антигенпредставляющих клеток: дендритных клеток, Т и В лимфоцитов, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и др. – уже весьма детально изучен и представлен в ряде обзоров [24–26]. Согласно этим данным для осуществления мониторинга за состоянием “здоровья” клеток иммунная система привлекает антигенпредставляющие клетки для сбора антигенов из микроокружения других клеток и представляет их CD8+ Т лимфоцитам в форме пептидов, ассоциированных с МНС1 молекулами (главного комплекса гистосовместимости, класс 1) [24, 25]. Конформационные различия структуры эпитопов антигенных белков L1 различных типов па-

пилломавирусов составляют примерно 7–15 ангстрем [23] и поэтому, вероятно, может быть допустимым перекрестное праймирование при наличии больших доз антигенных белков в вакцине.

Рассматривая полученные результаты, мы видим, что на рис. 2 (слева) на электрофореграмме присутствует только одно пятно, соответствующее молекулярной массе 56 кДа. Высокое соответствие продукта трансляции задаваемой матрицей при синтезе белка является характерным свойством растительных экспрессионных систем. Более того, вирусные контролирующие элементы: репликазы, промоторы, энхансеры, цис-и транс-элементы, обеспечивающие полицистронный характер трансляции в природных условиях, способствуют также прочтыванию длинных матриц в рекомбинантных генетических конструкциях. Микробиальные (дрожжевые, бактериальные) же экспрессионные системы характеризуются тем, что в них часто происходят преждевременные остановки трансляции вследствие разнообразных блокаторов экспрессии. Это приводит к накоплению неполноразмерных, промежуточных продуктов синтеза, достаточно различающихся по массе. Данное обстоятельство является значительным препятствием для биотехнологических работ по созданию вакцин, так как требуются дополнительные затраты на очистку и концентрацию целевого белкового продукта, что неизбежно приводит к удорожанию вакцин. С другой стороны, бактериальные системы отличаются высокой степенью протеолиза, что может

снижать выход целевого продукта [27–29]. Белок ВПЧ6 L1, полученный в нашей растительной экспрессионной системе, представляет собой вполне однородное белковое соединение, судя по рис. 2.

Целевой продукт в нашей растительной экспрессионной системе по данным ДСН электрофореза составляет на 18 сут инкубации примерно одну треть от общего растворимого белка (ОРБ) и более (табл. 1). Поэтому нет необходимости в очистке конечного продукта и дальнейшей его концентрации для пероральной вакцинации, так как содержание 200–300 мкг на мг ОРБ примерно соответствует концентрации белков L1 в Гардасиле. Поэтому мы полагаем, что для создания профилактической вакцины против аногенитальных папилломатозов и рецидивирующих респираторных папилломатозов, в том числе и высококанцерогенных, перспективно использовать растительные экспрессионные системы.

Эти данные позволяют считать перспективным создание вакцин с меньшим числом антигенных белков, что, с одной стороны, существенно уменьшает трудоемкость и стоимость процесса изготовления вакцины, а с другой стороны, увеличивает эквивалентную дозу нейтрализующих антител при снижении количества ее компонентов. Показано, что увеличение числа компонентов вакцины не приводит к усилению ее эффективности [30], возможно, не только из-за разбавления титра антител при многих компонентах вакцины, а также в результате иммунных нарушений [18].

Таким образом, в настоящей работе рассмотрена предпосылка для реальной перспективы создания пероральной растительной профилактической вакцины более широкого спектра действия, включая аногенитальные и высококанцерогенные типы папилломавирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *van Doorslaer K.* // *Virology*. 2013. V. 445. P. 11–20.
2. *Yu. Y., Guo J., Li D., Liu Y. et al.* // *Vaccine*. 2018. V. 36. P. 4927–4934.
3. *Shin T.H., Pankhong P., Yan J. et al.* // *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2012. V. 8. P. 470–478.
4. *Garbuglia A.R., Lapa D., Sias C. et al.* // *Frontiers in Immunol.* 2020. V. 11. Article 188.
5. *Bonagura V.R., Hatam L.J., Rosenthal D.W. et al.* // *APMIS*. 2010. V. 118. P. 455–470.
6. *Hatam L.J., DeVoti J.A., Rosenthal D.W. et al.* // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 1925–1935.
7. *Venkatesan N.N., Pine H.S., Underbrink M.P.* // *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2012. V. 45. P. 671.
8. *Maglennon G.A., McIntosh P., Doorbar J.* // *Virology*. 2011. V. 414. P. 153–163.
9. *Gravitt P.* // *J. Clin. Investigat.* 2011. V. 121. P. 4593–4599.
10. *Yakely A.E., Avni-Singer L., Oliveira C.R. et al.* // *Sex Transm. Dis.* 2019. V. 46. P. 213–220.
11. *Egawa N., Doorbar J.* // *Virus Research*. 2017. V. 231. P. 119–127.
12. *Roden R.B.C., Stern P.L.* // *Nature Reviews Cancer*. 2018. V. 18. P. 240–254.
13. *Guiliano A.R., Palefsky J.M., Goldstone S., Moreira E.D. et al.* // *The New England J. of Medicine*. 2011. V. 364. P. 401–411.
14. *Harper D.M., Vierthaler S.L., Santee J.A.* // *J. of Vaccines and Vaccination*. 2010. V. 1. P. 1–7.
15. *Gi R.E.A.T.P., Giorgi M.R.M., Pawlita M. et al.* // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2016. V. 273. P. 3231–3236.
16. *Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al.* // *CA: Cancer J. Clin.* 2018. V. 68. P. 394–424.
17. *Bruni L., Albero G., Serrano B. et al.* // *Human papillomavirus and related diseases report. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer. WORLD*. 2019. 306 p.
18. *Beziat V.* // *Human Genetics*. 2020. V. 139. P. 919–939.
19. *Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S.* // *Doklady Biochem. Biophys.* 2019. V. 484. P. 52–54.
20. *Koundal V., Mohd Q., Haq R., Praveen S.* // *Biochem. Genet.* 2011. V. 49. P. 25–38.
21. *Haque F., Guo P.* // *RNA Nanotechnology and Therapeutics: Methods and Protocols. Chapter 1. Methods in Molecular Biology*. 2015. V. 1297. P. 1–19.
22. *Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Tretyakova A.V.* // *Doklady Biochem. Biophys.* 2017. V. 474. P. 186–188.
23. *Bishop B., Dasgupta J., Klein M. et al.* // *The journal of Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 31803–31811.
24. *Cruz F.M., Colbert J.D., Merino E. et al.* // *Annu. Rev. Immunol.* 2017. V. 35. P. 149–176.
25. *Blander M.J.* // *Annu. Rev. Immunol.* 2018. V. 36. P. 717–753.
26. *Muntjewerff E.M., Meesters L.D., van den Bogaart G.* // *Frontiers in Immunol.* 2020. V. 11. Article 1276.
27. *Kim S.N., Jeong H.S., Park S.N., Kim H.-J.* // *J. of Virol. Methods*. 2007. V. 139. P. 24–30.
28. *Wei M., Wang D., Li Z., Song S. et al.* // *Emerging Microbes and Infections*. 2018. V. 7. Article 160. P. 1–12.
29. *Tomita J., Shirasawa H., Simizu B.* // *Journal of Virology*. 1987. V. 61. P. 2389–2394.
30. *Kwak K., Jagu R., Jiang S. et al.* // *PLOS ONE*. 2013. V. 8. e60507.

THE SYNTHESIS OF MAIN CAPSID PROTEIN OF ANOGENITAL TYPE HPV6 L1 IN PLANT EXPRESSION SYSTEM ON THE BASE OF TOMATO FRUITS

N. I. Rekoslavskaya^{a,b,#}, Corresponding Member of RAS R. K. Salyaev^a, and A. S. Ctolbikov^a

^a *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

^b *The Irkutsk Scientific Centre, Irkutsk, Russian Federation*

[#] *e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru*

The HPV6 L1 major capsid protein of anogenital type was synthesized in the plant expression system on the base of tomato fruits. The content of HPV6 L1 was appreciated as high as 380 mkg per 1 mg of total soluble protein of raw fruit mass that was presented as the single band with molecular mass of 56 kDa on the SDS electropherogram. Orally administrated to mice, the vaccine material from transgenic with HPV6 L1 tomato fruit induced highly effective antibody immune response of the strong titer. The cross-reactivity was found during the interaction of antibody to protein HPV6 L1 from peripheric blood serum of mice vaccinated with HPV6 L1 with antigenic proteins HPV16 L1, HPV18 L1, HPV31 L1 and HPV45 L1. This was suggested a perspective of the creation of vaccine with broad reactivity against dangerous anogenital papillomatoses and cervical cancer.

Keywords: anogenital papillomatoses, HPV6 L1, peroral immunization of mice, cross-reactivity of antibody to protein HPV6 L1 with antigenic proteins HPV16 L1, HPV18 L1, HPV31 L1 and HPV45 L1