

ЗАТВЕРДЖУЮ
Керівник підприємства/установи/організації
(Грантоотримувача)

Директор ІКБГІ НАН України
академік НАН України
Микола КУЧУК



(підпис)
М.П.

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок
«Біосинтез в рослинах рекомбінантних фармацевтичних білків, які протидіють
поширенню деяких інфекційних захворювань вірусного та бактеріального походження»
(назва Проєкту)

Назва конкурсу: «Наука для безпеки людини та суспільства»
Реєстраційний номер Проєкту: 2020.01/0301

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок
Реєстраційний номер 2020.01/0301 «Біосинтез в рослинах рекомбінантних фармацевтичних
білків, які протидіють поширенню деяких інфекційних захворювань вірусного та бактеріального
походження»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця
конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства» протокол від «16-17» вересня 2020 року
№ 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту:
Початок – 23 жовтня 2020 р.

Закінчення – 15 грудня 2021 р.

Загальна вартість Проєкту, грн.: 7 097 400,00 грн. (сім мільйонів дев'яносто сім тисяч чотириста
грн. 00 коп.)

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 1 237 000,00 грн. (один мільйон двісті тридцять сім тисяч грн. 00 коп)

2-й рік 5 860 400,00 грн. (п'ять мільйонів вісімсот шістдесят тисяч чотириста грн. 00 коп)

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту було залучено 10 виконавців, з них:

доктори наук 2;

кандидати наук 6;

інші працівники 2.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Грантоотримувач: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, адреса: м.Київ, вул. академіка Заболотного 148.

Субвиконавці: немає

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Отримати трансгенні рослини, в яких проходить експресія генів інтерферону альфа 2b та білків бактеріоцинів, а також оптимізувати технологію синтезу відповідних білків методом транз'єнтної експресії.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

1. Оптимізувати генетичні вектори та створити біотехнологічні рослини в яких проходить експресія генів інтерферону альфа 2b та білків бактеріоцинів.
2. Визначити антивірусну активність рослин, в яких проходить експресія рекомбінантного білку людського інтерферону альфа 2b.
3. Визначити антибактеріальну активність рослин, в яких проходить експресія білків бактеріоцинів.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Про експресію в рослинах функціонального інтерферону вже повідомлялось в таких трансгенних рослинах як морква, ріпак, цикорій (Matvieieva *et al.*, 2012). Також опубліковані результати досліджень, у яких довели, що бактеріоцини можна синтезувати у рослинах, за допомогою методу транз'єнтної експресії. Була доведена можливість їх використання в якості харчових добавок (Schulz *et al*, 2015; Schneider *et al*, 2018).

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Вперше була проведена стабільна генетична трансформація рослин їстівних видів геном коліцину M та рослин томату геном інтерферону альфа 2b. Трансгенні рослини показали високий рівень антибактеріальної та антивірусної активності. Розробленого методу з використанням культури рослин *in vitro*, який базується на довготривалій транз'єнтній експресії цільового гена, що відбувається завдяки системному поширенню генетичної конструкції.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Робота проводилась за використання генетичних векторів, що містять послідовності фармацевтичних білків інтерферону альфа 2b та білків-бактеріоцинів. Використання цих векторів дозволяє отримувати фармацевтичні білки як методом транз'єнтної (тимчасової) експресії так і створювати генетично модифіковані рослини, в яких експресія відповідного гену відбувається постійно. Обидва підходи було реалізовано при виконанні проєкту.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Вперше були створені трансгенні рослини томату, в яких відбувається експресія антивірусного білку - інтерферону людини (HuIFN α -2b). Інтерферон людини HuIFN α -2b,

синтезований в трансгенних рослинах томату, проявляв біологічну активність як *in vitro* в модельній системі (культура клітин мавпи, заражена вірусом), так і *in vivo* при зараженні живих мишей вірусом везикулярного стоматиту. В листках трансгенних томатів сорту Шедевр біологічна активність була в сотні разів вищою ніж для інших трансгенних рослин і становила $850 \cdot 10^3$ МО на 1 г сирової ваги.

При виконанні проекту вперше були створені їстівні трансгенні рослини, в яких підтверджено експресію антибактеріального білку-бактеріоцину - коліцину М. Для отриманих трансгенних листових овочів (салат, мізуна, капуста кале) та коренеплодів (морква) була підтверджена антибактеріальна активність, що проявляється у припиненні росту різних штамів *Escherichia coli*. Накопичення рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах салату становило біля 50 мкг на 1 мг сирової ваги, а антибактеріальна активність рослинних екстрактів становила в середньому $4 \cdot 10^3$ УО.

Для однорічних видів з коротким вегетаційним періодом (салати, мізуна, томати) були отримані нащадки трансгенних рослин (F1), проведений аналіз та підтверджено успадкування трансгенів та трансгенних ознак у наступному поколінні рослин. Наявність рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах була підтверджена методом вестерн-блот. Для обох фармацевтичних білків (інтерферону та коліцину М) було підтверджено збереження функціональної активності у висушеному рослинному матеріалі, що дає можливість використовувати порошок з висушених трансгенних рослин як готовий фармацевтичний препарат.

Оптимізовані векторні генетичні конструкції, що несуть гени коліцину М та інтерферону- α 2b, які були вдосконалені шляхом злиття послідовностей рекомбінантних цільових білків з послідовністю сигнальних пептидів (апопластного тагетінгу) та з послідовностями bхHis-tag для аналізу білків методом Western Blot.

Проведеними дослідженнями трансгенних коренів встановлено: можливість отримання трансгенних рослин шляхом прямої регенерації з «бородатих» коренів цикорію та мангольду з геном *ifn- α 2b* людини. Показана здатність до накопичення інтерферону HuIFN α -2b та антивірусна активність трансгенних коренів пекинської капусти та мангольду.

Розроблено новий метод отримання рекомбінантних білків (на прикладі репортерного білка GFP) з використанням культури рослин *in vitro*, який базується на довготривалій (декілька місяців) транзійтній експресії цільового гена, що відбувається завдяки системному поширенню генетичної конструкції. При використанні цього методу вміст цільових рекомбінантних білків у рослинах може досягати 47 % від сумарних розчинних білків.

Рекомбінантний коліцин М в рослинах *Nicotiana benthamiana* також був отриманий за допомогою нового, розробленого при виконанні проекту, методу з використанням культури рослин *in vitro*, який базується на довготривалій транзійтній експресії цільового гена, що відбувається завдяки системному поширенню генетичної конструкції.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Науково-технічна продукція відсутня

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Проєкт не передбачає проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

Трансгенні рослини, в яких відбувається експресія гену інтерферону, з підтвердженою антивірусною активністю можуть бути використані в подальших дослідженнях по запобіганню та

лікуванню вірусних інфекцій людей та тварин. Методики та вектори для генетичної трансформації рослин можуть бути використані в біотехнологічних лабораторіях для наукових досліджень та гетерологічної експресії рекомбінантних білків в рослинах.

Коліцини, синтезовані в рослинах, були визнані Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA) як GRAS (безпечні для споживання) та дозволені для застосування в якості антибактеріальних засобів. Отримані біотехнологічні рослини, в яких відбувається синтез коліцину M можуть бути використані для виділення антибактеріального білку, або використані безпосередньо як добавка, принаймні для корму тварин.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проекту

головний науковий співробітник

(посада)

Микола КУЧУК

ПІБ



(підпис)