

**Назва проєкту: Ефективна вакцина проти COVID-19 на основі клітин гуманізованих штамів дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*, що містять на зовнішній поверхні клітин ковалентно прикріплені білки вірусу SARS-CoV-2**

**Науковий керівник проєкту: акад. НАН України Сибірний Андрій Андрійович, Інститут біології клітини НАН України, м. Львів**

### **Анотація проєкту**

Метою пропонованого проєкту є створення недорогої пероральної вакцини проти COVID-19 головним чином на основі різних фрагментів білка S вірусу SARS-CoV-2, а також додатково білків , M, E та N, презентованих на поверхні гуманізованих штамів дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*. Презентацію антигенів на поверхні дріжджів буде здійснено шляхом злиття глікозилфосфатидилінозитол-заякорених білків клітинної стінки з *Saccharomyces cerevisiae* із вірусними білками. Суспензію термічно оброблених клітин дріжджів буде введено лабораторним тваринам перорально/назально або внутрішньом'язово і порівняно продукцію нейтралізуючих антитіл IgA та IgG до SARS-CoV-2 при різних типах введення препарату. Буде проаналізовано проліферацію Т-клітин та експресію цитокінів IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 після введення вбитих клітин дріжджів з поверхнево-презентованими вірусними білками. Буде досліджено захисну дію поверхнево-презентованих вірусних білків, що вводитимуться різними шляхами у трансгенних мишей, при інфікуванні цих тварин різними штамми SARS-CoV-2.

Таким чином, вакциною для орального або спреєвого застосування служитимуть прогріті клітини спеціально сконструйованих дріжджів, що на поверхні міститимуть коронавірусні білки. Таку вакцину здатні виробляти вітчизняні виробники, а в разі її високої ефективності можна буде планувати також експорт продукції.

### **Мета наукового проєкту**

Основною метою дослідження є розробка ефективної та дешевої оральної/назальної вакцини, що захищає від інфекції SARS-CoV-2, за рахунок клонування генів, що кодують різні фрагменти білка шипа (S), а також додатково білків мембрани (M),

оболонки (E) та нуклеокапсиду (N) SARS-CoV-2 та презентації цих білків на поверхні клітин гуманізованого штаму метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*. Імуногенність отриманих клітин дріжджів буде перевірено на лабораторних тваринах після перорального, назального та внутрішньом'язового введення.

### **Обґрунтування**

COVID-2019 – це респіраторне вірусне захворювання, яке спричинило світову пандемію, з (на час підготовки проєкту) 260 мільйонами підтверджених випадків захворювання та більше 5 мільйонів летальних випадків. Збудником інфекції, що викликає COVID-19, виявився коронавірус, подібний на раніше описаний коронавірус SARS-CoV, тому його було названо SARS-CoV-2. Геномом вірусу є велика одноланцюгова молекула РНК, що кодує кілька відкритих рамок зчитування. Основні відкриті рамки зчитування кодують структурні білки вірусу, а саме білок шипа (S), мембрани (M), оболонки (E) та нуклеокапсиду (N). Одним з найважливіших є білок шипа (S-білок), злитий глікопротеїн класу I, який опосередковує приєднання вірусу до рецепторів клітинної поверхні з його подальшим поглинанням в ендосоми. S білок є гомотримером, кожен з мономерів має 2 субодиниці, S1 і S2. Субодиниця S1 містить рецептор-зв'язуючий домен (RBD), який зв'язується з ангіотензинперетворювальним ферментом 2 АПФ2 (рецептор ACE2) людини (Letko et al. 2020). Геном SARS-CoV-2 розшифрований і є загальнодоступним (Wu et al. 2020).

Глобальна пандемія, спричинена SARS-CoV-2, поставила перед людством ряд важливих завдань, які включають пошук та розробку ефективних заходів та фармацевтичних засобів, що захищатимуть від інфікування. Найефективнішим превентивним заходом для запобігання тяжкого перебігу COVID-19 та поширення захворювання серед населення є вакцинація. Було розроблено кілька типів вакцин: вакцина на основі мРНК, що індукує експресію антигенів *in vivo* після ін'єкції мРНК, інкапсульованої у наночастинках ліпідів; вакцини на основі рекомбінантних білків (преважно на основі S білка); вакцини на основі вірусів-векторів; ДНК-вакцини; та вакцини на основі інактивованого вірусу SARS-CoV-2 (Amanat and Krammer 2020). Вакцини на основі рекомбінантних білків вірусу, а конкретніше, S-білка, на даний час розробляються кількома компаніями, такими як Novavax, Sanofi Pasteur, Clover тощо (Almond et al.

2020). S-білок шипа продукується переважно з використанням клітин ссавців або комах, що робить таке виробництво доволі дорогим.

У цьому проекті ми описуємо абсолютно новий тип вакцини проти COVID-19, а саме дріжджові клітини з ковалентно зв'язаними на поверхні білками S, M, E та N вірусу SARS-CoV-2. Таку вакцину можна використовувати перорально або як спрей для носа, рота та горла. Оральні/назальні вакцини на додаток до гуморальної імунної відповіді IgG сприяють локальній імунній відповіді IgA. Антитіла IgA забезпечують першу лінію захисту від SARS-CoV-2. З цієї точки зору пероральні/назальні вакцини мають значну перевагу перед внутрішньом'язовими вакцинами (Sterlin et al. 2021). Як організм для експресії рекомбінантних білків, буде використано гуманізований штам неконвенційних дріжджів *K. phaffii* (Choi et al. 2003). Використання цих дріжджів забезпечує простоту та низьку вартість нарощування біомаси, при цьому посттрансляційні модифікації, зокрема, глікозилювання синтезованих білків в цьому організмі відбувається за еукаріотичним типом. Різні N- і C-домени GPI-якірних білків клітинної стінки використовуються як інструменти для презентації чужорідних білків на поверхні дріжджів (Essen et al. 2020; Shibasaki and Ueda 2016). Кілька чужорідних білків, таких як  $\alpha$ -амілаза, антиген іридовірусу червоного ляща, Сар-білок цирковірусу свині типу 2, антиген вірусу грипу H7N9 та антиген *Helicobacter pylori*, були презентовані на поверхні *S. cerevisiae* (Chen et al. 2021; Khaw et al. 2006; Lei et al. 2020; Patterson et al. 2015; Tamaru et al. 2006). Метилотрофні дріжджі *K. phaffii* використовувалися для презентації покращеного зеленого флуоресцентного білка (EGFP); жовтого ферменту *Kluyveromyces lactis* (KYE); гемаглютиніну високопатогенного вірусу грипу птахів; глікопротеїну E2 вірусу класичної лихоманки свиней та антигена вірусу Зіка (Li et al. 2020; Mergler et al. 2004; Silva et al. 2021; Wang et al. 2007; Wasilenko et al. 2010). Інший вид метилотрофних дріжджів *Ogataea polymorpha* з такою метою поки що не застосовувався. Нещодавно почала розглядатися можливість презентації вірусних антигенів на поверхні мікробної клітини для створення вакцин проти COVID-19, які можна використовувати перорально або як спрей. Було запропоновано використовувати в якості вакцин вбиту бактерію *Escherichia coli* з редукованим геномом з поверхнево-експресованим пептидом злиття SARS-CoV-2 або ослаблену бактерію *Francisella tularensis*, з презентованими білками коронавірусу M та N (Jia et al. 2021; Maeda et al. 2021). Також запропоновано використовувати як вакцину проти COVID-19 вбиті нагріванням клітини *S. cerevisiae* з поверхнево-презентованим рецептор-зв'язуючим доменом білка шипа SARS-CoV-2 (Gao et al. 2021). Дріжджі в цілому мають суттєві переваги як носії поверхнево-

презентованих антигенів у порівнянні з бактеріями (Kumar and Kumar 2019). Серед дріжджів гуманізовані штами *K. phaffii* та *O. polymorpha* мають переваги перед *S. cerevisiae* у випадку поверхневої презентації глікозилізованих білків, як у випадку з білками SARS-CoV-2.

### **Новизна проєкту**

Новизна даного проєкту полягає в тому, що буде розроблено першу пероральну або назальну вакцину проти COVID-19 на основі дріжджових клітин з ковалентно зв'язаними білками SARS-CoV-2 S, M, E та N, презентованими на поверхні клітини. Будуть розроблені вектори для експресії генів зазначених вірусних білків в гуманізованих штаммах метилотрофних дріжджів *K. phaffii* та *O. polymorpha*. Незважаючи на те, що подібні підходи вже використовуються іншими групами вчених (усі відповідні публікації датовані 2021 роком; див.: (Gao et al. 2021; Jia et al. 2021; Maeda et al. 2021), розробка пероральних вакцин дотепер проводилася або на основі клітин умовно-патогенних бактерій (*E. coli*, *F. tularensis*), або на пекарських дріжджах *S. cerevisiae*. Усі три системи або взагалі не здатні глікозилувати білки SARS-CoV-2, або не здатні глікозилувати їх належним чином. Запропонована нами система експресії буде створена на основі гуманізованого штаму метилотрофних дріжджів *K. phaffii*, в яких глікозилування білків відбувається так само, як у клітинах ссавців (Choi et al. 2003; Li et al. 2006). Крім того, дріжджі *K. phaffii* відомі як одні з найефективніших дріжджових продуцентів гетерологічних білків і для них були розроблені сучасні інструменти генної інженерії. (De et al. 2021; Schwarzshans et al. 2017). Однак до цього часу ніхто не конструював рекомбінантні штами *K. phaffii* з вірусними білками SARS-CoV-2, ковалентно зв'язаними з глікопротеїнами зовнішньої клітинної стінки, що ми плануємо зробити в рамках даного проєкту. Після завершення конструювання отримані рекомбінантні клітини будуть перевірені на імуногенність та на захист від інфекції SARS-CoV-2 після орального, назального та внутрішньом'язового введення на лабораторних моделях тварин.

### **Методологія дослідження**

В роботі використовуватимуться гуманізовані штами метилотрофних дріжджів *K. phaffii* (США) та *O. polymorpha* (Південна Корея). Під час виконання проєкту будуть використані біоінформатичні, молекулярно-генетичні, біохімічні, загально мікробіологічні та аналітичні методи для бактерій та дріжджів. З метою аналізу геному

використовуваних видів дріжджів застосовуватимуться наступні ресурси: <http://www.yeastgenome.org/>, <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Picpa1/Picpa1.home.html>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Стандартні методи клонування будуть застосовані, як описано (Sambrook et al. 2012). Геномну ДНК дріжджів буде виділено за допомогою набору для очищення геномної ДНК Wizard® (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикційні та ДНК-лігаза (Fermentas, Vilnius, Lithuania) будуть використовуватися відповідно до специфікацій виробника. Виділення плазміди з *E. coli* буде здійснюватися за допомогою системи очищення ДНК Wizard® Plus SV Minipreps (Promega, Madison, WI, USA). Фрагменти ДНК будуть розділені в агарозному гелі (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Виділення фрагментів з гелю буде здійснюватися за допомогою набору для елюції ДНК (Millipore, Bedford, MA, США). ПЛР-ампліфікацію фрагментів ДНК буде здійснено за допомогою високоточної ДНК-полімерази Platinum® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) відповідно до специфікації виробника. ПЛР проводитимуть у термоциклері GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Трансформація дріжджів здійснюватиметься шляхом електропорації або хімічної трансформації, як описано раніше (Sambrook et al. 2012). Концентрації глюкози та інших джерел вуглецю (наприклад, гліцерину, метанолу, етанолу) у культуральному середовищі аналізуватиметься методом ВЕРХ (PerkinElmer, Series 2000, USA) за допомогою іонообмінної колонки Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA). Кількісна ПЛР проводитиметься за допомогою системи ПЛР у реальному часі Applied Biosystems 7500 із використанням набору Max Mix SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) відповідно до інструкцій виробника. Набір векторів для експресії відповідних генів-мішеней буде сконструйовано на основі плазміди рPIC9K, що містить ген *HIS4* для відбору дріжджових трансформантів. Така система відбору не потребує селективних маркерів, що надають стійкість до антибіотиків, і таким чином не виникає проблема потенційного горизонтального перенесення генів. Касети експресії будуть включати послідовності, що кодують сигнал секреції  $\alpha$ -фактора для секреції рекомбінантних білків в культуральне середовище; білки S, M, E, N SARS-CoV-2; а також різні фрагменти S-білка та фрагменти різних GPI-якірних білків клітинної стінки (Aga1, Sag1, Sed1, Flo1, Flo9, Pir1). Додаткові N- і С-кінцеві сегменти, включаючи полярні та гнучкі лінкери, багаті на гліцин та серин, будуть використовуватися для фланкування вірусних білків для модуляції потенційних білково-білкових взаємодій та полегшення секреції білків-мішеней. Послідовності FLAG- та

6xHIS-елементів будуть інтегровані на N- або C-кінці вірусних білків для подальшого підтвердження презентації білків-мішеней на поверхні клітин дріжджів шляхом імунофлуоресцентного та імуноферментного аналізу. Початковий вектор та компоненти експресійних касет будуть об'єднані за допомогою Gibson assembly або NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. Для перевірки коректності конструювання отримані плазміди буде секвеновано.

Попередній скринінг відібраних трансформантів на здатність продукувати цільові білки буде проведено методом Вестерн-блот з комерційно доступними антитілами до SARS-CoV-2, FLAG та 6xHIS. Підтвердження наявності цільових білків на поверхні клітини здійснюватиметься за допомогою імунофлуоресцентного та імуноферментного аналізу. Подальше збільшення кількості білків-мішеней на поверхні клітини буде здійснено шляхом оптимізації складу поживного середовища, умов індукції та культивування. Культивування рекомбінантних штамів, що продукують вірусні білки, проводитиметься в біореакторі BioFlo® 120 Eppendorf, як описано нами раніше (Dmytruk et al. 2014). За допомогою методу Вестерн-блот, також, буде проаналізовано стабільність дріжджових клітин при тривалому їх зберіганні.

Восьмитижневі самки мишей BALB/c ( $n = 15$  на групу) будуть орально, назально або внутрішньом'язово імунізовані 150 мкл антигену дріжджових клітин на першу та другу добу з метою первинної імунізації, а також 14 та 15 добу для повторної імунізації. Як контроль буде використана аналогічна доза нетрансформованих дріжджів або PBS. Зразки крові ( $n = 10$  на групу) та кал ( $n = 10$  на групу) збиратимуть у вакцинованих мишей на 12 та 25 день після первинної імунізації. Титри IgA та IgG антитіл до SARS-CoV-2 перевірятимуть за допомогою ІФА. Для оцінки проліферації Т-клітин у мишей BALB/c після оральної, назальної та внутрішньом'язової імунізації будуть використовуватися спленоцити, отримані з вакцинованих мишей ( $n = 5$  на групу) на 12 та 25 день після первинної вакцинації за допомогою МТТ-тесту. Для дослідження клітинно-опосередкованої імунової відповіді рівень експресії гамма-інтерферону (IFN- $\gamma$ ) та інтерлейкіну-2, -4, -6 (IL-2, IL-4, IL-6) буде проаналізовано в спленоцитах, у порівнянні із інактивованими спленоцитами за допомогою наборів ІФА (R&D Systems, USA). Також, буде перевірено активність нейтралізації SARS-CoV-2 за допомогою сироватки, отриманої від мишей, імунізованих відповідними імуногенами. Вірусні частинки будуть попередньо змішані з серійними розведеннями сироваток з різних груп тварин і в подальшому інокульовано на клітини Vero. Вірусну інфекцію відстежуватимуть за цитопатичним ефектом через три дні після зараження. Титри

нейтралізації вірусу визначатимуться як найвищі розведення сироватки, які продемонстрували повний захист від цитопатичної дії SARS-CoV-2.

## **Поетапний план робіт виконання проекту**

**1. Дизайн нуклеотидних послідовностей для клонування генів білків шипа (S), мембрани (M), оболонки (E) та нуклеокапсиду (N) вірусу SARS-CoV-2 та замовлення їх хімічного синтезу.**

Цілі: Сконструювати послідовності ДНК, які відповідають генам РНК вірусу SARS-CoV-2, та кодують білки S, M, E та N

Заплановані завдання: Метою цього проекту є розробка ефективної пероральної вакцини, що захищає від COVID-19, та складається з вбитих нагріванням клітин дріжджів з ковалентно зв'язаними на зовнішній поверхні білками S, M, E та N вірусу SARS-CoV-2. На даному етапі роботи буде розроблено дизайн нуклеотидних послідовностей відповідних генів з урахуванням частоти використання кодонів у дріжджах, зокрема у *K. phaffii* та *O. polymorpha*. Крім того, буде розроблено кілька варіантів послідовностей S-білка з врахуванням найпоширеніших мутацій (стандартний уханський, британський, індійський «Дельта», бразильський штами тощо). Послідовність ДНК мембранного білка M матиме два варіанти: з трансмембранними доменами або без них, оскільки незрозуміло, чи буде секретуватися нативний мембранний білок з клітин дріжджів. Хімічний синтез нуклеотидних послідовностей ДНК буде замовлено у відповідної компанії. Маніпуляції з іншими послідовностями ДНК, що будуть використовуватись для майбутнього конструювання векторів, будуть проводитись за допомогою методів молекулярної біології співавторами цієї пропозиції. Індикатори виконання: Результатом цього етапу буде дизайн послідовностей ДНК, що кодують білки S, M, E та N, які будуть хімічно синтезовані і надалі використані для експресії у дріжджових клітинах.

**2. Клонування синтетичних генів S, M, E і N у вектори *K. phaffii* та *O. polymorpha* під контролем сильних конститутивного та індукованих промоторів з додаванням секреторного сигналу  $\alpha$ -фактора *S. cerevisiae* та ряду послідовностей, що кодують якірні білки.**

Цілі: Метою цього етапу є клонування генів, що кодують білки S, M, E та N вірусу SARS-CoV-2 під контролем сильних промоторів разом з послідовністю сигналу секреції та лінкерами для презентації вірусних білків на поверхні дріжджових клітин.

Заплановані завдання: Цей етап є ключовим для успіху всього проекту. У разі успішного його виконання, це стане передумовою для створення гуманізованих штамів дріжджів *K. phaffii* та *O. polymorpha*, які продукують різні фрагменти білка шипа (S), а також білків мембрани (M), оболонки (E) та нуклеокапсиду (N) вірусу SARS-CoV-2, презентовані на поверхні клітин. Буде клоновано декілька варіантів білка шипа. Серед них білок стандартного уханського штаму та білки найпоширеніших мутантних форм: британського, бразильського та індійського «Дельта» штамів вірусу. Усі гени будуть експресовані під контролем сильних конститутивних промоторів генів *K. phaffii* та *O. polymorpha* гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази *GAP1 (TDH3)*, або індукованих метанолом і репресованих глюкозою або етанолом промоторів генів алкогольоксидази *AOX1*. Наявність секреторного сигналу  $\alpha$ -фактору *S. cerevisiae* забезпечуватиме секрецію, а поверхнева локалізація вірусних білків буде досягнена шляхом з'єднання з рядом GPI-якірних білків клітинної стінки. 6xHis- або FLAG-мітка буде з'єднана з усіма вірусними білками для полегшення подальшого підтвердження презентації цільового білка на поверхні дріжджів.

Індикатори виконання: Результатом цього етапу буде конструювання описаних векторів для експресії вірусних білків, які будуть перевірені відповідними молекулярними методами.

### **3. Відбір дріжджових трансформантів та їх перевірка на здатність до продукції та презентації експресованих вірусних білків.**

Цілі: Ціллю цього етапу буде отримання рекомбінантних штамів дріжджів з закореними на поверхні білками вірусу SARS-CoV-2, та підтвердження поверхневої локалізації цих білків.

Заплановані завдання: Метою цього етапу є селекція трансформантів дріжджів *K. phaffii* та *O. polymorpha* з поверхневою локалізацією білків шипа (S), мембрани (M), оболонки (E) та нуклеокапсиду (N) вірусу SARS-CoV-2. Напівкількісне визначення вірусних білків буде здійснюватися за допомогою Вестерн-блоттингу з використанням антитіл до кожного вірусного білка. Локалізація кожного з експресованих білків буде підтверджена за допомогою імуофлуоресценції з первинними моноклональними антитілами до 6xHis або FLAG-мітки та вторинними антитілами Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG



(антитіла кози до IgG мишей) з подальшим імуофлуоресцентним аналізом та проточною цитометрією. Ми очікуємо позитивних сигналів при імуофлуоресцентному та проточно-цитометричному аналізах.

Індикатори виконання: Результатом цього етапу буде підтвердження локалізації експресованих білків вірусу SARS-CoV-2 на поверхні клітини відібраних дріжджових трансформантів.

#### **4. Оптимізація презентації вірусних білків на поверхні дріжджових клітин шляхом інтеграції лінкерів між якірними та цільовими білками та підбору умов культивування та індукції для максимального накопичення біомаси та поверхневої локалізації білків-мішеней.**

Цілі: Метою етапу є модифікація штамів дріжджів та оптимізація умов культивування сконструйованих штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* для досягнення максимального накопичення біомаси та локалізації цільових білків на поверхні клітин.

Заплановані завдання: Додаткові N- і C-кінцеві домени, включаючи полярні та гнучкі лінкери, багаті на гліцин та серин, будуть використані для фланкування вірусних білків для модуляції потенційних білково-білкових взаємодій та полегшення секреції білків-мішеней. Такий підхід сприятиме локалізації вірусних білків на поверхні клітин дріжджів. Оптимізація умов культивування рекомбінантних клітин буде проводитися в лабораторних біореакторах об'ємом 1 і 5 літрів. Будуть випробувані періодичний, періодичний з додаванням субстрату та безперервний режими культивування дріжджів. Буде вивчено вплив умов ферментації (температура, рН та аерація), компонентів поживного середовища та вихідної біомаси на ріст рекомбінантних штамів та презентацію цільових білків на їх поверхні.

Індикатори виконання: Результатом цього етапу буде розробка лабораторних протоколів вирощування продуцентів вірусних білків для досягнення максимальної продукції біомаси та локалізації цільових білків на поверхні клітин дріжджів.

#### **5. Дослідження продукції антитіл проти SARS-CoV-2 (S, M, E і N білків) підкласів IgA та IgG, оцінка проліферації Т-клітин та визначення експресії цитокінів IFN- $\gamma$ та IL-2, IL-4, IL-6 в спленоцитах мишей BALB/c після перорального та назального введення в порівнянні з внутрішньом'язовою імунізацією вбитими дріжджовими клітинами з різною густиною презентації вірусних антигенів на поверхні клітин.**

Цілі: Ціль цього етапу – довести імуногенні властивості отриманих клітин дріжджів.

Заплановані завдання: Для оцінки гуморальних та клітинних імунних реакцій, індукованих вірусними білками на поверхні дріжджів *K. phaffii* та *O. polymorpha*, на 14 та 28 день після первинної імунізації відбиратимуть сироватку крові та кал мишей, імунізованих перорально та назально, а також внутрішньом'язово. Титри IgG у сироватках крові та IgA в калі визначатимуться методом ІФА. Для оцінки проліферації Т-клітин з вакцинованих мишей одержуватимуть спленоцити і визначатимуть проліферацію Т-клітин. Для ідентифікації клітинної відповіді на поверхневі вірусні білки буде досліджено експресію цитокінів IFN- $\gamma$  та IL-2, IL-4, IL-6. Крім того, буде проведено аналіз імунної відповіді слизової оболонки, індукованої клітинами дріжджів з поверхневими вірусними антигенами. Буде вивчено, чи пероральне/назальне введення в порівнянні з внутрішньом'язовим введенням клітин з поверхневими вірусними білками викликає суттєві гуморальні та слизові імунні реакції під час імунопрофілактики.

Індикатори виконання: Результатом цього етапу буде підтвердження, що пероральне/назальне введення дріжджових клітин з поверхневими вірусними антигенами є високо або помірно імуногенним.

#### **6. Вивчення захисної дії дріжджових клітин сконструйованих штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* з поверхневими вірусними антигенами на трансгенних мишах та хом'яках після зараження SARS-CoV-2.**

Цілі: Метою цього етапу є доведення ефективності використання клітин дріжджів з поверхневими вірусними антигенами для захисту чутливих лабораторних тварин від інфекції, викликаної SARS-CoV-2.

Заплановані завдання: Буде досліджено ефективність захисту, індукованого дріжджовими клітинами сконструйованих штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* з поверхневими вірусними антигенами проти зараження SARS-CoV-2. Спочатку сироватки крові, одержані з вакцинованих мишей, будуть проаналізовані на здатність до нейтралізації вірусу SARS-CoV-2. Будуть визначені титри нейтралізації, які є ключовим параметром для прогнозування імуногенності вакцини-кандидата. Згодом трансгенні миші та хом'яки з людським рецептором ACE2 будуть заражені летальними дозами різних штамів вірусу SARS-CoV-2 без і з попереднім введенням клітин *K. phaffii* з поверхневими вірусними антигенами пероральним та внутрішньом'язовим способом. Буде проаналізовано виживання лабораторних тварин. Буде зроблено висновок щодо

ефективності сконструйованих дріжджових клітин з поверхневими вірусними білками як пероральної вакцини проти SARS-CoV-2.

Індикатори виконання: Результатом цього етапу буде розробка протоколу для перорального введення поверхневих вірусних антигенів для захисту чутливих лабораторних тварин від SARS-CoV-2.

### **Обґрунтування спроможності виконання проєкту**

Ми маємо значний досвід експресії власних та чужорідних білків у конвенційних і неконвенційних дріжджах. Метилотрофні дріжджі *K. phaffii* (*P. pastoris*), що використовуватимуться в цьому проєкті, були одним із об'єктів наших попередніх досліджень, а саме нами описано експресію власних та гетерологічних генів, пов'язаних з аутофагією *ATG26*, *ATG28*, *ATG35* та гена *FBP1* (кодує фруктозо-1,6-бісфосфатазу), злитого із зеленим флуоресцентним білком (Dmytruk et al. 2020b; Nazarko et al. 2011; Stasyk et al. 2008b; Stasyk et al. 2006). Крім того, ген *K. phaffii FPS1*, що кодує транспортер гліцерину, був клонований і експресований в іншому виді метилотрофних дріжджів *Ogataea polymorpha* (Semkiv et al. 2019). Також ми виконуємо грант НФДУ (№ 2020.01/0080) щодо конструювання гуманізованих штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що продукують пептидні фрагменти білка шипа SARS-CoV-2 та вірусоподібні частинки. Ми маємо значний досвід роботи із попередньо згаданими термотолерантними неконвенційними дріжджами *O. polymorpha*, оскільки нами були створені продуценти власних та гетерологічних білків, що беруть участь у сенсингу та транспорті глюкози (Stasyk et al. 2008a; Stasyk et al. 2004), ферментації ксилози (Dmytruk et al. 2008; Kurylenko et al. 2014; Kurylenko et al. 2018; Ruchala et al. 2017; Ruchala and Sibirny 2020; Vasylyshyn et al. 2020), гетерологічних білків, що беруть участь у деградації крохмалю та ксилану (Voronovsky et al. 2009), а також гетерологічних білків аналітичного та медичного призначення, таких як глюкозооксидаза, проінсулін і поверхневий антиген вірусу гепатиту В HBsAg, який використовується як основний компонент вакцин проти гепатиту В (Krasovska et al. 2007; Krasovska et al. 2013). Варто зазначити, що штам *O. polymorpha*, що експресує вірусний білок HBsAg, накопичував велику кількість цього антигену – до 9% загального клітинного білка. Ця кількість дорівнює або перевищує найвищі отримані концентрації вірусного білка HBsAg, описані у патентній та науковій літературі. Такий результат було досягнуто завдяки оригінальному методу відбору генетично стабільних трансформантів із мультикопійною інтеграцією вірусного гена і з використанням мутанта з дефектом репресії вуглецевого катаболізму *gcr1* та біогенезу

пероксисом *rex3Δ*. Ген, що кодує білок HBsAg експресувався під контролем сильного або індукованого глюкозою та ксилозою промотора (Krasovska et al. 2013). Усі зазначені фактори були передумовами високої та стабільної експресії вірусного білка.

Слід також згадати наші роботи з експресії власних та гетерологічних білків, що забезпечують надпродукцію рибофлавіну та флавінових коензимів ФМН і ФАД у флавіногенних дріжджах *Candida famata* (Dmytruk et al. 2014; Dmytruk et al. 2020a; Dmytruk et al. 2011; Yatsyshyn et al. 2014; Yatsyshyn et al. 2009). На основі дріжджів *S. cerevisiae* ми також сконструювали перші анаеробні надпродуценти гліцерину (Semkiv et al. 2017) та покращені продуценти етанолу (Semkiv et al. 2014; Semkiv et al. 2016). Важливо згадати, що керівник цього проєкту (Андрій Сибірний) також брав участь у створенні продуцента гетерологічного протипухлинного білка аргініндеїмінази з *Mycoplasma hominis* у *E. coli* (Fayura et al. 2013). Підсумовуючи, варто зазначити, що керівник цього проєкту має значний досвід у експресії гетерологічних білків в конвенційних і неконвенційних дріжджах, а також у бактеріях, включаючи роботи щодо надекспресії білка вірусу гепатиту В, а, отже, здатний успішно виконати запропонований проєкт. Крім цього, усі учасники проєкту мають чималі знання і практичні вміння у галузі даного проєкту. Д.б.н. Костянтин Дмитрук є співавтором публікацій, що стосуються клонування та експресії гетерологічних білків у *K. phaffii*, *O. polymorpha*, *S. cerevisiae* та флавіногенних дріжджах *Candida famata*; к.б.н. Олена Дмитрук є експертом з механізмів деградації білків у *K. phaffii*. Молоді вчені к.б.н. Марта Семків – провідний спеціаліст із клонування генів у *S. cerevisiae* та *O. polymorpha*, к.б.н. Роксолана Васишин має досвід та публікації щодо клонування та експресії гетерологічних генів у *O. polymorpha*, Анастасія Зазуля має великий досвід у клонуванні генів *K. phaffii*; к.б.н. Марина Старикович також працює в галузі клітинної біології. За даними Scopus, h-індекс керівника проєкту (акад. А. Сибірний)-34, кількість цитувань - 12569; Учасники: д.б.н. К. Дмитрук, h-індекс 16, кількість цитувань - 3994; к.б.н. О. Дмитрук, h-індекс 5, кількість цитувань - 95; к.б.н. М. Семків, h-індекс 6, кількість цитувань - 101; к.б.н. М. Старикович, h-індекс 4, кількість цитувань – 38; к.б.н. Р. Васишин h-індекс 3, кількість цитувань - 26; молодий учений А. Зазуля має одну публікацію в міжнародному журналі (*Cell Biology International*, 2020, і ще не індексується у Scopus), молодий вчений А. Царук лише нещодавно розпочала роботу в інституті після закінчення навчання в університеті;. Отже, команда проєкту має високу кваліфікацію та підготована до успішного виконання запропонованого проєкту.

Відділ молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України,

м. Львів, має сучасне обладнання, необхідне для успішної роботи над проектом. А саме, у відділі є ротаційні інкубаційні шейкери для вирощування мікроорганізмів (виробництво New Brunswick Scientific, USA, та Heidolph, Germany), 3 спектрофотометри UV-VIS (Helios Thermo Scientific), 2 фотоелектроколориметри (Helios Thermo scientific, UK), флуориметр (Turner, USA), кисневий монітор YSI для аналізу дихання (USA), 5 центрифуг Eppendorf (Germany), одна високошвидкісна центрифуга Sorvall (USA), 3 ПЛР машини (Applied Biosystems, USA, Eppendorf, Germany), низькотемпературна морозильна камера, апарати для гель-електрофорезу, Вестерн-гібридизації та інше стандартне лабораторне обладнання. Лабораторія також обладнана ламінарними боксами, термостатами, автоклавами тощо. Перелічене вище обладнання буде використовуватися для виконання проекту. Для успішної реалізації пропонуваного проекту ми плануємо придбати таке обладнання: ампліфікатор для проведення ПЛР у реальному часі, 5-літрову скляну ємність для біореактора, нанодроп, систему для блотингу, UV/VIS-рідер, ротаційні інкубаційні шейкери та дрібне обладнання, таке як лабораторні ваги, камера для електрофорезу, 3-D шейкер, магнітна мішалка, набори одноканальних дозаторів (див. нижче).

**Обсяг фінансування, необхідний для виконання наукового дослідження (розробки), з відповідним обґрунтуванням та наданням відповідного вичерпного переліку за кожною окремою статтю витрат по роках:**

Загальні витрати на заробітну плату в рамках проекту складуть 6 270 000 грн. Керівник проекту проф. А. Сибірний та вісім учасників проекту (д.б.н. К. Дмитрук, к.б.н. О. Дмитрук, к.б.н. М. Семків, к.б.н. Р. Васишин, к.б.н. М. Старикович, молодий учений А. Зазуля, інженер А. Царук) будуть отримувати місячну заробітну плату від 10 000 до 60 000 грн. Усі співробітники Інституту біології клітини, які беруть участь у проекті, працюватимуть у проекті протягом 20 місяців.

Для реалізації запропонованого проекту необхідно закупити реактиви та матеріали. Відповідні кошти будуть виділені на хімічний синтез генів з адаптованими послідовностями для експресії у дріжджах, праймерів, секвенування рекомбінантних плазмід тощо. Для забезпечення запланованої роботи будуть придбані хімічні сполуки, включаючи агарозу, акриламід/біс-акриламід, компоненти культуральних середовищ, дріжджовий екстракт, пептон, агар, джерела вуглецю та азоту та інші компоненти культурального середовища, хімічні речовини для буферів, реактиви, необхідні для молекулярної роботи (ферменти для молекулярної біології, набори для лігування,

маркери молекулярної маси, набори для очищення ПЛР-фрагментів, набори для очищення ДНК з гелю, набори для виділення РНК та інші), сорбенти, фільтри для холодної стерилізації, лабораторне скляне та пластикове приладдя (колби, пробірки, чашки Петрі, кювети для електропорації, кювети для спектрофотометра, наконечники, пробірки для мікроцентрифуги та пробірки для ПЛР). Таким чином, витрати на придбання матеріалів протягом виконання проєкту становитимуть: 100 000 грн у 2021 році, 1 200 000 грн у 2022 році та 800 000 грн у 2023 році.

Для здійснення проєкту у 2021 році планується придбання мініавтоклаву вартістю 50 000 грн. Прилад призначено для стерилізації середовищ та посуду.

У 2022 році планується придбати ампліфікатор CFX Opus 96 (Bio-Rad) для проведення ПЛР у реальному часі. Вартість приладу становить 1 200 000 грн. Прилад призначено для виконання завдань, що заплановані у даному проєкті. Зокрема будуть визначатися рівні експресії цільових генів. Для здійснення проєкту у 2022 році планується придбати 5-літрову скляну посудину для біореактора, яка використовуватиметься для попереднього підрощування клітин, оптимізації умов культивування та індукції для максимальної продукції біомаси та презентації цільових білків на поверхні дріжджових клітин (400 000 грн). У 2022 році планується придбати Нанодроп вартістю 610 000 грн для визначення концентрацій ДНК, РНК та білків в мікрокількостях. Також планується придбати систему для напівсухого блоттингу вартістю 90 000 грн. Крім того, планується закупівля невеликого обладнання: ваги (34 000 грн); блок для електрофорезу (34 000 грн); 3-D шейкер (18 000 грн); магнітна мішалка (14 000 грн.) на загальну суму 100 000 грн. Два набори одноканальних дозаторів Research plus (Eppendorf), змінного об'єму (0.1 – 2.5 µl); (0.5 – 10 µl); (2 – 20 µl); (20 – 200 µl); (100 – 1000 µl); (1 – 5 ml) (100 000 грн.)

У 2023 році планується придбати автоматичний UV/VIS-рідер (1 200 000 грн). Цей прилад буде використовуватися для ІФА та імуофлюоресцентного аналізу штамів дріжджів, що презентують вірусні білки на поверхні клітини. У 2023 році також планується придбати два ротаційні інкубаційні шейкери для вирощування мікроорганізмів (800 000 грн.).

Витрати на місцеві відрядження заплановані для проф. А.А. Сибірного у 2022 р. (40 000 грн) та 2023 р. (40 000 грн). У 2022 та 2023 роках витрати на закордонні відрядження становитимуть по 160 000 гривень для проведення експериментів з тваринами. Загальна вартість поїздок складе 400 000 грн.

В 2021 році будуть заплановані послуги, що включають синтез вірусних генів з адаптованими для дріжджів кодонами, синтез праймерів, секвенування цільових

послідовностей вартістю 300 000 грн. В 2022 та 2023 роках заплановано виконання експериментів на лабораторних тваринах, що будуть виконуватися за кордоном. Вартість цих послуг становитиме 1 000 000 грн в 2022 р. та 1 000 000 грн в 2023 р.

Загальні непрямі витрати в рамках проєкту складуть 1 680 000 гривень. Непрямі витрати включатимуть комунальні витрати та заробітну плату технічному персоналу. Непрямі витрати становитимуть 80 000 грн в 2021р., 1 000 000 грн у 2022 р., 600 000 грн у 2023 р.

### **Очікувані результати виконання проєкту:**

а) Опис наукової або науково-технічної продукції (у разі її наявності), яка буде створена в результаті виконання проєкту (із зазначенням її очікуваних якісних та кількісних (технічних) характеристик).

На сьогоднішній день, не існує пероральної вакцини проти COVID-19, тому основною метою запропонованого проєкту є розробка такої вакцини. Для цього буде створено гуманізовані штами метилотрофних дріжджів *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що продукуватимуть різні фрагменти білка S, а також додатково білки M, E і N SARS-CoV-2 і презентуватимуть їх на зовнішній поверхні клітини дріжджів шляхом ковалентного з'єднання з клітинною стінкою через ряд GPI-якірних білків. Для ефективної експресії вірусних білків буде застосовано сильні конститутивні промотори гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази або сильні індуквані промотори алкогольоксидази (індукується метанолом, репресується глюкозою) обох видів дріжджів. Для секреції білка, синтетичні гени вірусних білків будуть зв'язані на 5'-кінці з сигнальною послідовністю  $\alpha$ -фактора *S. cerevisiae*, тоді як для забезпечення їх локалізації на поверхні клітин, їх буде злито із N-кінцем білка  $\alpha$ -аглютиніну *S. cerevisiae* Aga2, який, у свою чергу, буде з'єднаний дисульфідними зв'язками з Aga1  $\alpha$ -аглютиніном (Gao et al. 2021). Також будуть використані додаткові варіанти GPI-якірних білків, такі як аглютинін ScSag1, GPI-глікопротеїн клітинної стінки ScSed1, флокуліни ScFlo1, KpFlo9 та білок з внутрішніми повторами KpPir1. Відомо, що ефективна секреція білків-мішеней корелює з їх презентацією на клітинній поверхні. Для покращення секреції вірусних білків, будуть введені полярні та гнучкі лінкери, що фланкують N- та C-кінцеві продовження цільових білків. Рівень експресії рекомбінантних модулів, що містять сигнал секреції, вірусні гени та GPI-якори, буде визначатися за допомогою qRT-PCR, тоді як рівень експресії відповідних вірусних білків перевірятиметься за допомогою ІФА. Поверхнева локалізація білків-мішеней визначатиметься імуофлуоресцентно. Суспензія вбитих

нагріванням клітин буде внутрішньом'язево, перорально та назально введена лабораторним тваринам, для виявлення у тварин нейтралізуючих антитіл до SARS-CoV-2. Також, буде проаналізовано проліферацію Т-клітин та експресію цитокінів IFN- $\gamma$  та IL-2, IL-4, IL-6 після введення антигенів і досліджено захисну дію поверхнево-презентованих вірусних білків, що вводитимуться різними шляхами трансгенним мишам та хом'якам при подальшому інфікуванні різними штамами SARS-CoV-2. (рис.).

б) Обґрунтування переваг очікуваної наукової або науково-технічної продукції (у разі її наявності) у порівнянні з існуючими аналогами.

Існують аналогічні розробки, однак вони базуються або на умовно-патогенних бактеріях, або на дріжджах *S. cerevisiae*, які не здатні глікозилувати білки за типом людських клітин. Наша пропозиція не має зазначених недоліків.

в) Обґрунтування практичної цінності запланованих результатів проекту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок).

Оральна/назальна вакцина проти COVID-19 має важливе значення для суспільства та економіки. Крім того, пероральна вакцина, представлена інактивованими дріжджовими клітинами з поверхнево-локалізованими вірусними антигенами, може бути легко впроваджена у національне виробництво. Отримана вакцина має бути одночасно ефективною та дешевою.

### **Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання проєкту в суспільній практиці.**

Після успішного конструювання рекомбінантних штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* з презентованими на поверхні клітин білками SARS-CoV-2, їх тестування на імуногенність та захист лабораторних тварин від вірусної інфекції, створені дріжджові продуценти будуть впроваджені в виробництво в Україні. Пошук промислових об'єктів для такого впровадження не складатиме великої проблеми. Однією з потенційних можливостей є використання біотехнологічних заводів, наприклад обладнання Приватного акціонерного товариства «Enzym», Львів; біотехнологічної компанії «Enzim Group», м. Ладижин, Вінницька область. Інша можливість – це залучення однієї з фармацевтичних компаній, таких як Індар, Фармак тощо. Промисловість повинна мати обладнання для вирощування дріжджів, сепарації та термічної інактивації.

**Можливі ризики, що можуть вплинути на реалізацію проєкту та шляхи їх**



## запобігання чи вирішення.

Існує ряд ризиків, що можуть вплинути на реалізацію проекту:

1. Експресовані вірусні білки не секретуватимуться і не презентуватимуться на поверхні клітин. Щоб подолати цю проблему, будуть використані альтернативні сигнали секреції (наприклад, інвертази, інулінази або кіллерного токсину) та альтернативні поверхневі якірні білки дріжджів (наприклад, Cwp1, Cwp2, Tip1, Tir1, Srp1 (Liu et al. 2014; Moura et al. 2015) замість Aga2, Sag1, Sed1, Flo1, Flo9 та Pir1. Крім того, для полегшення правильного згортання та секреції цільових білків, буде клоновано та надекспресовано гени, що кодують шаперони дріжджів (*KAR2*, *PDII*, *ERO1*, *HSP70*, *HSP104* тощо (Raschmanova et al. 2021) Якщо цільові вірусні білки все ще не секретуватимуться і не презентуватимуться на поверхні, буде використано альтернативні дріжджі, такі як *S. cerevisiae*.
2. Експресія вірусних білків буде низькою. Для посилення експресії буде здійснена мультикопійна інтеграція синтетичних вірусних генів за рахунок селекції з використанням пошкодженого селективного маркера.

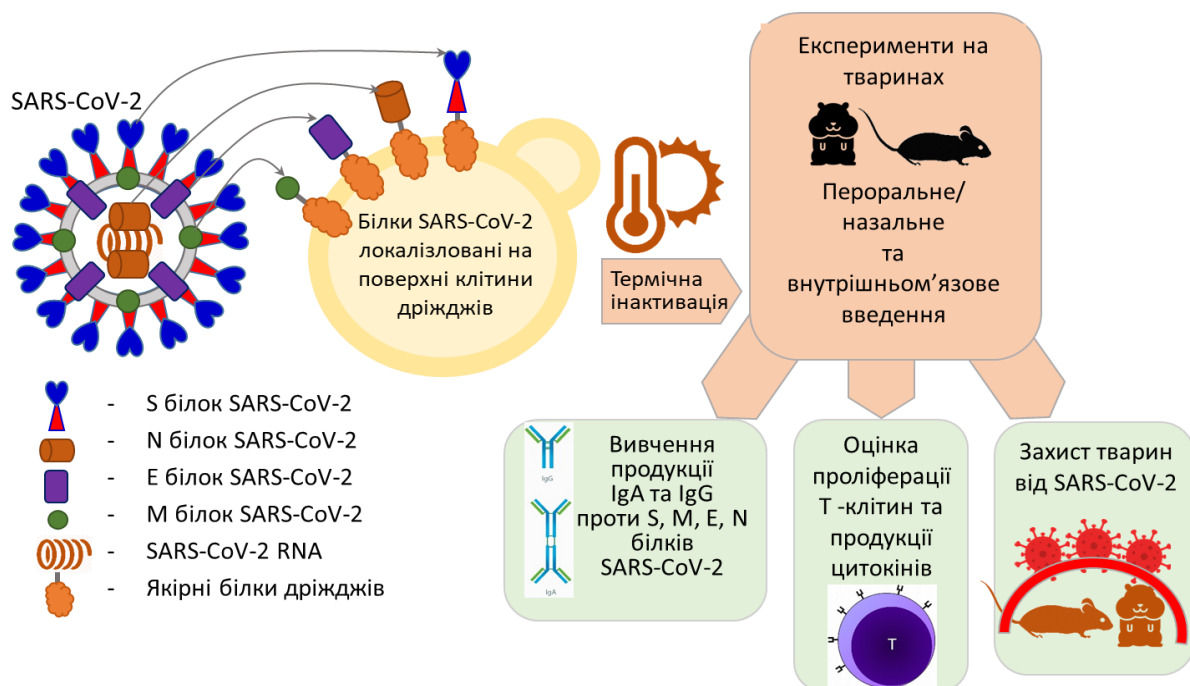


Рисунок. Схема розробки та тестування оральної/назальної вакцини проти COVID-19 на основі поверхнево локалізованих вірусних антигенів SARS-CoV-2 у гуманізованих дріжджів *Komagataella phaffii*

## ЖИТЕПАТҮПА

- Almond J et al. (2020) Development of vaccines at the time of COVID-19 *microLife* 1:uqaa003 doi:10.1093/femsm/luqaa003
- Amanat F, Krammer F (2020) SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report *Immunity* 52:583-589 doi:10.1016/j.immuni.2020.03.007
- Chen Z, Xiao Y, Weber G, Wei R, Wang Z (2021) Yeast cell surface display of bacterial PET hydrolase as a sustainable biocatalyst for the degradation of polyethylene terephthalate *Methods in enzymology* 648:457-477 doi:10.1016/bs.mie.2020.12.030
- Choi BK et al. (2003) Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5022-5027 doi:10.1073/pnas.0931263100
- De S, Mattanovich D, Ferrer P, Gasser B (2021) Established tools and emerging trends for the production of recombinant proteins and metabolites in *Pichia pastoris* *Essays in biochemistry* doi:10.1042/EBC20200138
- Dmytruk K, Lyzak O, Yatsyshyn V, Kluz M, Sibirny V, Puchalski C, Sibirny A (2014) Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production *Journal of biotechnology* 172:11-17 doi:10.1016/j.jbiotec.2013.12.005
- Dmytruk KV, Ruchala J, Fedorovych DV, Ostapiv RD, Sibirny AA (2020a) Modulation of the Purine Pathway for Riboflavin Production in Flavinogenic Recombinant Strain of the Yeast *Candida famata* *Biotechnology journal*:e1900468 doi:10.1002/biot.201900468
- Dmytruk KV, Yatsyshyn VY, Sybirna NO, Fedorovych DV, Sibirny AA (2011) Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production *Metabolic engineering* 13:82-88 doi:10.1016/j.ymben.2010.10.005
- Dmytruk O, Bulbotka N, Zazulya A, Semkiv M, Dmytruk K, Sibirny A (2020b) Fructose-1,6-bisphosphatase degradation in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* occurs in autophagy pathway *Cell biology international* doi:10.1002/cbin.11304
- Dmytruk OV, Voronovsky AY, Abbas CA, Dmytruk KV, Ishchuk OP, Sibirny AA (2008) Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* *FEMS yeast research* 8:165-173 doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00289.x
- Essen LO, Vogt MS, Mosch HU (2020) Diversity of GPI-anchored fungal adhesins *Biological chemistry* 401:1389-1405 doi:10.1515/hsz-2020-0199
- Fayura LR, Boretsky YR, Pynyaha YV, Wheatley DN, Sibirny AA (2013) Improved method for expression and isolation of the *Mycoplasma hominis* arginine deiminase from the recombinant strain of *Escherichia coli* *Journal of biotechnology* 167:420-426 doi:10.1016/j.jbiotec.2013.06.025
- Gao T, Ren Y, Li S, Lu X, Lei H (2021) Immune response induced by oral administration with a *Saccharomyces cerevisiae*-based SARS-CoV-2 vaccine in mice *Microbial cell factories* 20:95 doi:10.1186/s12934-021-01584-5
- Jia Q, Bielefeldt-Ohmann H, Maison RM, Maslesa-Galic S, Cooper SK, Bowen RA, Horwitz MA (2021) Replicating bacterium-vectored vaccine expressing SARS-CoV-2 Membrane and Nucleocapsid proteins protects against severe COVID-19-like disease in hamsters *NPJ vaccines* 6:47 doi:10.1038/s41541-021-00321-8
- Khaw TS, Katakura Y, Koh J, Kondo A, Ueda M, Shioya S (2006) Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains for direct ethanol production from raw starch *Applied microbiology and biotechnology* 70:573-579 doi:10.1007/s00253-005-0101-z

- Krasovska OS et al. (2007) Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression *Biotechnology and bioengineering* 97:858-870 doi:10.1002/bit.21284
- Krasovska OS, Stasyk OV, Sibirny AA (2013) Stable overproducer of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* due to multiple integration of heterologous auxotrophic selective markers and defect in peroxisome biogenesis *Applied microbiology and biotechnology* 97:9969-9979 doi:10.1007/s00253-013-5223-0
- Kumar R, Kumar P (2019) Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application *FEMS yeast research* 19 doi:10.1093/femsyr/foz007
- Kurylenko OO, Ruchala J, Hryniv OB, Abbas CA, Dmytruk KV, Sibirny AA (2014) Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation *Microbial cell factories* 13:122 doi:10.1186/s12934-014-0122-3
- Kurylenko OO, Ruchala J, Vasylyshyn RV, Stasyk OV, Dmytruk OV, Dmytruk KV, Sibirny AA (2018) Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha* *Biotechnology for biofuels* 11:197 doi:10.1186/s13068-018-1203-z
- Lei H, Xie B, Gao T, Cen Q, Ren Y (2020) Yeast display platform technology to prepare oral vaccine against lethal H7N9 virus challenge in mice *Microbial cell factories* 19:53 doi:10.1186/s12934-020-01316-1
- Letko M, Marzi A, Munster V (2020) Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses *Nature microbiology* 5:562-569 doi:10.1038/s41564-020-0688-y
- Li D et al. (2020) Surface display of classical swine fever virus E2 glycoprotein on gram-positive enhancer matrix (GEM) particles via the SpyTag/SpyCatcher system *Protein expression and purification* 167:105526 doi:10.1016/j.pep.2019.105526
- Li H et al. (2006) Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris* *Nature biotechnology* 24:210-215 doi:10.1038/nbt1178
- Liu Y, Zhang R, Lian Z, Wang S, Wright AT (2014) Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 106:17-25 doi:https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.04.011
- Maeda D et al. (2021) Killed whole-genome reduced-bacteria surface-expressed coronavirus fusion peptide vaccines protect against disease in a porcine model *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 doi:10.1073/pnas.2025622118
- Mergler M, Wolf K, Zimmermann M (2004) Development of a bisphenol A-adsorbing yeast by surface display of the *Kluyveromyces fragilis* yellow enzyme on *Pichia pastoris* *Applied microbiology and biotechnology* 63:418-421 doi:10.1007/s00253-003-1361-0
- Moura MV, da Silva GP, Machado AC, Torres FA, Freire DM, Almeida RV (2015) Displaying Lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* Using the Yeast Surface Display Approach: Prospection of a New Anchor and Characterization of the Whole Cell Biocatalyst *PloS one* 10:e0141454 doi:10.1371/journal.pone.0141454
- Nazarko VY et al. (2011) Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris* *Autophagy* 7:375-385 doi:10.4161/auto.7.4.14369
- Patterson R, Eley T, Browne C, Martineau HM, Werling D (2015) Oral application of freeze-dried yeast particles expressing the PCV2b Cap protein on their surface induce

- protection to subsequent PCV2b challenge in vivo *Vaccine* 33:6199-6205  
doi:10.1016/j.vaccine.2015.10.003
- Raschmanova H, Weninger A, Knejzlik Z, Melzoch K, Kovar K (2021) Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins *Applied microbiology and biotechnology* 105:4397-4414  
doi:10.1007/s00253-021-11336-5
- Ruchala J, Kurylenko OO, Soontornngun N, Dmytruk KV, Sibirny AA (2017) Transcriptional activator Cat8 is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* *Microbial cell factories* 16:36  
doi:10.1186/s12934-017-0652-6
- Ruchala J, Sibirny AA (2020) Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts *FEMS microbiology reviews* doi:10.1093/femsre/fuaa069
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4 edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Schwarzshans JP, Luttermann T, Geier M, Kalinowski J, Friehs K (2017) Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris* *Biotechnology advances* 35:681-710  
doi:10.1016/j.biotechadv.2017.07.009
- Semkiv M, Kata I, Ternavska O, Sibirny W, Dmytruk K, Sibirny A (2019) Overexpression of the genes of glycerol catabolism and glycerol facilitator improves glycerol conversion to ethanol in the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* *Yeast* 36:329-339 doi:10.1002/yea.3387
- Semkiv MV, Dmytruk KV, Abbas CA, Sibirny AA (2014) Increased ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing alkaline phosphatase *BMC biotechnology* 14:42  
doi:10.1186/1472-6750-14-42
- Semkiv MV, Dmytruk KV, Abbas CA, Sibirny AA (2016) Activation of futile cycles as an approach to increase ethanol yield during glucose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* *Bioengineered* 7:106-111 doi:10.1080/21655979.2016.1148223
- Semkiv MV, Dmytruk KV, Abbas CA, Sibirny AA (2017) Metabolic engineering for high glycerol production by the anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae* *Applied microbiology and biotechnology* doi:10.1007/s00253-017-8202-z
- Shibasaki S, Ueda M (2016) Oral Vaccine Development by Molecular Display Methods Using Microbial Cells *Methods in molecular biology* 1404:497-509 doi:10.1007/978-1-4939-3389-1\_32
- Silva AJD, Jesus ALS, Leal LRS, Silva GAS, Melo CML, Freitas AC (2021) *Pichia pastoris* displaying ZIKV protein epitopes from the Envelope and NS1 induce in vitro immune activation *Vaccine* 39:2545-2554 doi:10.1016/j.vaccine.2021.03.065
- Stasyk OG, Maidan MM, Stasyk OV, Van Dijck P, Thevelein JM, Sibirny AA (2008a) Identification of hexose transporter-like sensor HXS1 and functional hexose transporter HXT1 in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* *Eukaryotic cell* 7:735-746  
doi:10.1128/EC.00028-08
- Stasyk OV, Nazarko TY, Sibirny AA (2008b) Methods of plate pexophagy monitoring and positive selection for ATG gene cloning in yeasts *Methods in enzymology* 451:229-239 doi:10.1016/S0076-6879(08)03216-3
- Stasyk OV, Stasyk OG, Komduur J, Veenhuis M, Cregg JM, Sibirny AA (2004) A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* *The Journal of biological chemistry* 279:8116-8125  
doi:10.1074/jbc.M310960200

- Stasyk OV et al. (2006) Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* *Autophagy* 2:30-38 doi:10.4161/auto.2226
- Sterlin D et al. (2021) IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 *Science translational medicine* 13 doi:10.1126/scitranslmed.abd2223
- Tamaru Y, Ohtsuka M, Kato K, Manabe S, Kuroda K, Sanada M, Ueda M (2006) Application of the arming system for the expression of the 380R antigen from red sea bream iridovirus (RSIV) on the surface of yeast cells: a first step for the development of an oral vaccine *Biotechnology progress* 22:949-953 doi:10.1021/bp060130x
- Vasylyshyn R et al. (2020) Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast *Microbial cell factories* 19:96 doi:10.1186/s12934-020-01354-9
- Voronovsky AY, Rohulya OV, Abbas CA, Sibirny AA (2009) Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan *Metabolic engineering* 11:234-242 doi:10.1016/j.ymben.2009.04.001
- Wang Q, Li L, Chen M, Qi Q, Wang PG (2007) Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris* *Biotechnology letters* 29:1561-1566 doi:10.1007/s10529-007-9430-6
- Wasilenko JL, Sarmiento L, Spatz S, Pantin-Jackwood M (2010) Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using alpha-agglutinin for production of oral vaccines *Biotechnology progress* 26:542-547 doi:10.1002/btpr.343
- Wu F et al. (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China *Nature* 579:265-269 doi:10.1038/s41586-020-2008-3
- Yatsyshyn VY, Fedorovych DV, Sibirny AA (2014) Metabolic and bioprocess engineering of the yeast *Candida famata* for FAD production *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41:823-835 doi:10.1007/s10295-014-1422-7
- Yatsyshyn VY, Ishchuk OP, Voronovsky AY, Fedorovych DV, Sibirny AA (2009) Production of flavin mononucleotide by metabolically engineered yeast *Candida famata* *Metabolic engineering* 11:163-167 doi:10.1016/j.ymben.2009.01.004

## Бюджет

<b>Типи витрат</b>	<b>1-й рік 2021</b> (листопад- грудень) тис.грн.	<b>2-й рік 2022</b> (січень- грудень) тис.грн.	<b>3-й рік 2023</b> (січень- червень) тис.грн.
<b>Прямі витрати</b>	1020,0	8700,0	5900,0
• <b>Витрати на оплату праці, включаючи податки</b>	570,0	3800,0	1900,0
• <b>Матеріали та реагенти</b>	100,0	1200,0	800,0
• <b>Обладнання</b>	50	2500,0	2000,0
• <b>Поїздки</b>	-	200,0	200,0
<b>Інші прямі кошти (послуги)</b>	300,0	1000,0	1000,0
<b>Непрямі витрати (до 30% від витрат на оплату праці)</b>	80,0	1000,0	600,0
<b>Разом</b>	1100,0	9700,0	6500,0
<b>Разом витрати по проєкту</b>	17300,0		

Науковий керівник проєкту



А.А. Сибірний