

Received: 2014.01.30
Accepted: 2014.12.30
Published: 2015.03.22

Rośliny jako alternatywne źródło białek terapeutycznych*

Plants as an alternative source of therapeutic proteins

Marta Łucka^{1a}, Tomasz Kowalczyk¹, Janusz Szemraj², Tomasz Sakowicz¹

¹Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

²Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytet Medyczny

^{1a} Studentka V roku kier. Biotechnologia UŁ

Streszczenie

Ostatnie lata, przynoszą systematyczny wzrost zainteresowania ośrodków naukowych opracowaniem wydajnych, roślinnych systemów ekspresji heterologicznych białek o szerokim zastosowaniu. Stanowią alternatywę wobec systemów tradycyjnych wykorzystujących komórki bakteryjne, drożdżowe, owadzie czy ssące. Techniki identyfikacji, charakteryzowania i izolacji genów oraz skuteczne metody transformacji genetycznej roślin pozwalają na poszerzenie źródeł pozyskiwania produktów białkowych. Duże nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystania roślin jako swoistych bioreaktorów do produkcji białek o znaczeniu terapeutycznym. Metoda ma wiele zalet, z których najważniejsze to: możliwość znaczącego obniżenia kosztów produkcji, bezpieczeństwo stosowania otrzymanych produktów, czy tzw. obróbka potranslacyjna białka typowa dla komórek eukariotycznych. Grupą białek budzących największe zainteresowanie są liczne farmaceutyki, a wiele udanych doświadczeń potwierdza możliwość uzyskiwania heterogennych białek o potencjale terapeutycznym. Należą do nich m.in.: przeciwciała monoklonalne, antygeny szczepionkowe czy różne cytokiny. W pracy omówiono wybrane rekombinowane białka należące do trzech wymienionych grup, których ekspresję uzyskano w komórkach roślinnych. Białka te mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii lub prewencji wielu chorób wirusowych, bakteryjnych czy nowotworowych.

Słowa kluczowe:

rośliny transgeniczne • przeciwciała • szczepionki • cytokiny • białka terapeutyczne

Summary

In recent years, there has been an increased interest of researchers in developing efficient plant heterologous expression systems of proteins for a wide range of applications. It represents an alternative to the traditional strategy utilizing bacterial, yeast, insect or mammalian cells. New techniques of identification and characterization and effective methods of plant genetic transformation allow the range of recombinant protein products to be expanded. Great expectations are associated with the use of plants as bioreactors for the production of specific proteins of therapeutic interest. This strategy offers a number of advantages, the most important being: the possibility of a significant reduction in production costs, the safety of the products obtained and full eukaryotic post-translational modifications of proteins. A group of proteins of special interest is pharmaceuticals, and a number of successful experiments have confirmed the possibility of obtaining heterogeneous proteins with therapeutic potential: monoclonal antibodies, vaccine antigens, and a variety of cytokines. This work is focused on selected recombinant proteins belonging to those groups expression of which was achieved in plant cells. These proteins may be used in the future for therapy or prevention of viral, bacterial or cancer diseases.

Keywords:

transgenic plants • antibodies • vaccines • cytokines • therapeutic proteins

*Praca finansowana z projektu nr 2013/09/B/N27/01019.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1145824>

Word count: 3987
Tables: 3
Figures: 1
References: 91

Adres autora: dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasz Sakowicz, Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: tomesakowicz@wp.pl

Wykaz skrótów: **AIDS** – zespół nabytego niedoboru odporności, **bnMAb VRC01p** – monoklonalne przeciwciała o szerokim zakresie neutralizacji przeciwko wirusowi HIV-1, **CDC** – Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom, **EHEC** – enterokrwotoczne szczepy *E. coli*, **FDA** – Agencja ds. Żywności i Leków, **GD12** – pochodne przeciwciał przeciwwrycinowych, **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, **HBS** – wirus zapalenia wątroby typu B, **HC** – krwotoczne zapalenie okrężnicy, **HER2** – receptor typu 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu, **HbsAg** – antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B, **HbsAg** – antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B, **HPV** – wirus brodawczaka ludzkiego, **HUS** – zespół hemolityczno-mocznicy, **IFN** – interferon, **IgG** – jedna z klas przeciwciał, **IL** – interleukina, **mAb** – przeciwciała monoklonalne, **NHL** – chłoniak nieziarnicy, **OspA, OspA** – T-antygeny przeciwko boreliozie, **rhEPO** – rekombinowana ludzka erytropoetyna, **TBI** – ludzki wirus niedoboru odporności, **TNF** – czynnik martwicy nowotworów, **TSP** – całkowite białko rozpuszczalne (total soluble protein), **VEP** – białko otoczki wirusa zapalenia mózgu (encephalitis virus envelope protein), **VLP** – cząsteczki wirusopodobne (virus-like particles).

WSTĘP

Od lat biofarmaceutyki są integralną częścią szeroko rozumianego systemu ochrony zdrowia. Należy do nich bardzo wiele białek, podstawowych związków wykorzystywanych w terapii licznych schorzeń. Ich szczególne cechy czynią je atrakcyjnymi w porównaniu z lekami należącymi do innych grup związków. Białka te są: 1) bardzo swoiste, wykazując złożony mechanizm działania, często niemożliwy do zastąpienia przez inne cząsteczki, 2) rzadko zakłócają naturalne procesy fizjologiczne, wykazując minimalne działania niepożądane, 3) zwykle dobrze tolerowane przez organizm, rzadko indukując niepożądane odpowiedzi układu immunologicznego, 4) w przypadku chorób o podłożu genetycznym, mogą być skutecznym remedium, ograniczając konieczność stosowania terapii genowej, 5) czas potrzebny do wprowadzenia terapeutycznego białka do użycia bywa krótszy w porównaniu do leków innych grup, 6) unikatowość struktury i funkcji białek zapewnia im skuteczną ochronę patentową, istotną m.in. ze względów ekonomicznych [41].

Wraz z intensywnym rozwojem nowych technologii (w tym inżynierii genetycznej) pula bardziej skutecznych i mniej szkodliwych terapeutyków stale się poszerza. Możliwość transferu informacji genetycznej między niespokrewnionymi gatunkami stworzyła szansę ekspresji pożądanego białka poza organizmem naturalnego gospodarza, co dało alternatywę wobec produkcji terapeutyków uzyskiwanych tradycyjnymi metodami [50].

Obecnie stosunkowo niewiele białek terapeutycznych jest pozyskiwanych ze źródeł naturalnych. Zaawansowane technologie rekombinowanego DNA pozwalają optymalizować wytwarzanie białek w tak różnych systemach ekspresyjnych jak: komórki bakteryjne [88], drożdżowe [82], owadzie [12], ssacze [29]. Oprócz wymienionych, duże zainteresowanie budzą sposoby produkcji biofarmaceutyków w komórkach roślinnych (w tab. 1. zebrano dane nt. wybranych aspektów produkcji heterologicznych białek w różnych systemach ekspresyjnych).

O atrakcyjności roślin jako potencjalnych miejsc syntezy rekombinowanych białek decydują: 1) szczególne możliwości biosyntezy związków organicznych (fotosynteza) umożliwiające szybki przyrost biomasy oraz akumulacji białek przy stosunkowo niskich nakładach finansowych, 2) możliwość prowadzenia posttranslacyjnych modyfikacji białek, istotnych w przypadku pozyskiwania aktywnych białek organizmów eukariotycznych, 3) możliwość zastosowania różnych skali i układów (kultury zawiesinowe, hodowla *in vitro*, uprawa polowa), 4) brak ryzyka przenoszenia ludzkich czy zwierzęcych patogenów, co podnosi bezpieczeństwo produktu, 5) obniżenie kosztów związanych z koniecznością zastosowania wyspecjalizowanych metod oczyszczania finalnego produktu, 6) możliwość wyboru komórek i organów docelowych (nasiona, bulwy, liście), w których produkt jest najbardziej stabilny i występuje w dużych stężeniach, 7) możliwość niemal całkowitej automatyzacji produkcji białek i szybkość uzyskania białka z biomasy (kilka tygodni), co jest niezwykle

Tabela 1. Zestawienie systemów ekspresji rekombinowanych białek (wg [17])

System ekspresji	Koszt produkcji	Możliwość produkcji w dużej skali	Ryzyko zanieczyszczenia	Koszt przechowywania
Bakterie	niski	duża	endotoksyny	średnie
Drożdże	średni	duża	niskie	średnie
Komórki owadzie	wysoki	umiarkowana	wysokie	wysokie
Kultury komórek ssaczy	wysoki	bardzo mała	wirusy, priony	wysokie
Transgeniczne zwierzęta	wysoki	mała	wirusy, priony	wysokie
Roślinne kultury komórkowe	niski	duża	niskie	niskie
Transgeniczne rośliny	bardzo niski	bardzo duża	niskie	niskie

istotne w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na biofarmaceutyki (np. okres pandemii) [85].

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Jednym z terapeutyków uzyskiwanych z powodzeniem w systemach roślinnych są przeciwciała. To immunoglobuliny wytwarzane przez limfocyty B (komórki plazmatyczne), będące częścią systemu odpornościowego kręgowców. Wykazują zdolność rozpoznawania epitopów antygenów oraz ich skutecznej neutralizacji. Przeciwciała monoklonalne (mAb) są identycznymi kopiami cząsteczek immunoglobulin, mającymi tę samą strukturę i identyczną swoistość wobec danego epitopu. Znajdują szerokie zastosowanie w diagnostyce i leczeniu chorób zakaźnych czy nowotworowych. Pierwszy lek oparty na przeciwciałach monoklonalnych dopuszczono do stosowania przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków w 1986 r. Muromonab jest mysim przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG, swoistym dla antygeny DC3 limfocytów T, stosowanym w przeszłości w terapii immunosupresyjnej u pacjentów z reakcją odrzutu przeszczepu. Od tego czasu na rynku farmaceutycznym pojawiła się szeroka gama produktów, rutynowo stosowanych w terapii wielu schorzeń. Przeciwciała są drugą po szczepionkach grupą terapeutyków produkowaną na dużą skalę, co dodatkowo uzasadnia prowadzenie zaawansowanych badań [11]. Zalety roślinnych systemów ekspresyjnych, otwierają możliwości wydajnego źródła ich pozyskiwania. W 1989 r. pojawiło się pierwsze doniesienie o udanej transformacji genetycznej *N. tabacum*. Wprowadzony do tytoniu DNA, kodował łańcuchy gamma i kappa immunoglobulin. W transgenicznej roślinie uzyskano pożądaną formę w postaci jednoczesnej ekspresji obu wymienionych peptydów. Funkcjonalne przeciwciało, występujące w wysokim stężeniu (do 1,3% TSP, tj. całkowitej puli białek rozpuszczalnych), wykazywało wszystkie cechy analogicznych przeciwciał, pochodzących z mysich komórek hybrydoma [31]. Powyższe doświadczenie uchodzi za znaczące osiągnięcie współczesnej biotechnologii, potwierdza nowe możliwości pozyskiwania przeciwciał

monoklonalnych w alternatywnych do tradycyjnie stosowanych układach ekspresyjnych.

Przeciwciała monoklonalne wytwarzane w roślinach (plantibodies), można uzyskiwać w wyniku ekspresji stabilnej lub przejściowej, w gatunkach jedno- lub dwuliściennych, także w kulturach zawieszinowych komórek roślinnych. Ważnym osiągnięciem było opracowanie metody magnifekcji wykorzystującej infiltrację próżniową *Agrobacterium*, jako systemu wprowadzania do komórek roślinnych replikonów wirusa roślinnego [21]. Jej walorem jest wysoki poziom ekspresji pożądanego białka w bardzo krótkim czasie [32].

Wśród wielu medycznych zastosowań przeciwciał otrzymanych w roślinach, wyjątkowo obiecująca wydaje się możliwość ich użycia do celów biernej immunizacji. Obecnie, możliwe jest wytwarzanie przeciwciał, które mogą być stosowane w prewencji i terapii chorób wirusowych czy bakteryjnych. Nakanishi i wsp. opisują ekspresję dimerycznych, hybrydowych przeciwciał IgG/IgA, wykazujących zdolność neutralizacji toksyny Shiga 1 (Stx-1) wytwarzanej przez enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (EHEC) i będącej powodem krwotocznego zapalenia okrężnicy oraz zespołu hemolityczno-mocznicowego (odpowiednio HC, HUS) [56]. Infekcje enterokrwotocznymi szczepami *E. coli* wraz z zakażeniami *Shigella dysenteriae* występują prawie u 150 mln osób rocznie będąc przyczyną około 3 mln zgonów, stąd opracowanie skutecznej ochrony wydaje się niezwykle istotne [56]. Zakażenia takie są szczególnie niebezpieczne u dzieci poniżej 10 roku życia oraz u osób w wieku podeszłym, ze względu na największe prawdopodobieństwo wystąpienia HUS, prowadzącego do ostrej niewydolności nerek, anemii oraz małopłytkowości [47]. W pracy wykazano ekspresję hybrydowych przeciwciał w transgenicznych roślinach *A. thaliana*, przy zachowaniu biologicznej aktywności immunoglobulin do neutralizacji holotoksyny Stx1 *in vitro*. Dowodzi to możliwości generowania transgenicznych gatunków jadalnych roślin w celu ochrony przed zatruciami pokarmowymi wywołowanymi przez tę toksynę.

Tabela 2. Wybrane przeciwciała wytwarzane w różnych systemach ekspresyjnych roślin

Przeciwciało	Gospodarz	Miejsce ekspresji	Piśmiennictwo
Guy's 13	<i>N. tabacum</i>	korzenie włośnikowate, kultury zawieszinowe	[70]
CS-1	<i>N. benthamiana</i>	liście	[81]
BR55-2	<i>N. tabacum</i>	liście	[7]
2G12	<i>Z. mays</i>	nasiona	[62]
2F5	<i>N. tabacum</i> cv. <i>Bright yellow 2</i> (BY-2)	kultury zawieszinowe	[68]
MAK 33	<i>N. tabacum</i>	kalus	[15]
MAK33	<i>A. thaliana</i>	liście	[16]
GAN4B.5	<i>A. thaliana</i>	Cała roślina	[6]
CB.Hep1	<i>N. tabacum</i>	siewki	[80]

Przykładem możliwości neutralizacji toksycznego działania związków występujących w otoczeniu człowieka są wyniki badań O'Hary i wsp. [57]. Potwierdzają one możliwość produkcji w tytoniu (*N. benthamiana*) chimerycznych pochodnych przeciwciał przeciwwirusowych GD12 (cGD12), których regiony zmienne łańcuchów ciężkich i lekkich połączono ze strukturą ludzkich przeciwciał klasy IgG₁. Wykazano jednocześnie potencjał tych białek w neutralizacji toksyny w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Rezultaty badań potwierdzają zalety roślinnego systemu wytwarzania przeciwciał i otwierają możliwość wykorzystania takich białek przeciwko zatruciom toksyną.

Rycyna to niebezpieczne dimeryczne białko wydzielane przez rącznika pospolitego (*R. communis* L.). Po przedostaniu się do ustroju (zakwalifikowane do kategorii B w skali zagrożeń bioterrorystycznych przez CDC - Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom), może doprowadzić do śmierci, co uzasadnia prace nad modelami profilaktyki i terapii chorych poddanych intoksykacji tym białkiem. Również groźne neurotoksyny botulinowe, wytwarzane przez liczne serotypy *Clostridium botulinum* mogą być neutralizowane w podobny sposób, tj. dzięki produktom uzyskiwanym w transgenicznym roślinach [2]. Omawiany system umożliwia wydajną ekspresję jednołańcuchowych fragmentów zmiennych scFV C25 zdolnych w warunkach *in vitro* do neutralizowania toksyny BoNT/A.

Oprócz prac opisujących uzyskanie przeciwciał o właściwościach neutralizujących szkodliwe dla zdrowia toksyny, obszarem o dużym potencjale aplikacyjnym jest uzyskiwanie „roślinnych” przeciwciał antywirusowych. HIV jest wirusem, który zakaża na świecie około 2 mln ludzi rocznie i mimo intensywnych działań nad powstrzymaniem jego transmisji, skuteczność metod jest niewielka, co stawia go na czele listy najgroźniejszych patogenów (głównie w krajach rozwijających się). Zapotrzebowanie na sze-

roko dostępne, bezpieczne i tanie metody profilaktyki przedekspozycyjnej jest więc bardzo duże. Skutecznym czynnikiem profilaktycznym okazały się monoklonalne przeciwciała o szerokim zakresie neutralizacji przeciwko wirusowi HIV-1 (bnMAB VRC01p). Możliwość ich pozyskania oparte o wykorzystanie *N. benthamiana* przedstawia Hamorsky i wsp. [27]. Potwierdzono ich efektywną ekspresję w czasie kilku dni, przy zachowaniu neutralizujących właściwości wobec wirusa. Otrzymane immunoglobuliny wykazywały też synergiczne, przeciwwirusowe właściwości m.in. z lektyną GRFT, co stwarza możliwości opracowania kombinowanej terapii przeciwko epidemii wirusa HIV-1. Rosenberg i wsp. również przedstawili metodę szybkiego otrzymywania w tytoniu 6 przeciwciał monoklonalnych (b12, 2G12, 2F5, 4E10, m43, VRC01) neutralizujących wirusa HIV [65].

Przeciwwirusową aktywność przeciwciał pozyskanych z roślin opisano też względem rotawirusów. Zakażenia nimi są poważnym problemem ze względu na możliwość ciężkiego przebiegu choroby w postaci martwiczego lub krwotocznego zapalenia jelit, trzustki, mózgu i mózdzku czy kamicy układu moczowego prowadzącej do niewydolności nerek [48]. W nasionach transgenicznego ryżu doprowadzono do ekspresji fragmentów przeciwciał (MucoRice-ARP1), wykazujących zdolność neutralizacji rotawirusów [78]. Co ważne, białka te zachowują swoją aktywność nawet po rocznym okresie przechowywania oraz obróbce termicznej (94°C/30'). Doświadczenia te mogą być przykładem nowego podejścia w leczeniu schorzeń wywołanych tymi wirusami, szczególnie w sytuacjach przeciwskażeń do podawania szczepionek. Opracowana technologia może się okazać przydatna do wytwarzania przeciwciał przeciw innym patogenom lub schorzeniom jelitowym innego pochodzenia. Poza wspomnianymi przykładami, istnieją też liczne doniesienia na temat przeciwciał przeciwko takim

patogenom jak wirus wściekliczny [20,43], wirus Zachodniego Nilu [30,40] czy Ebola [59].

W opisywaną problematykę wpisują się też badania nad czynnikami terapeutycznymi w chorobach nowotworowych. I tak, w liściach *N. tabacum* uzyskano nimotuzumab - nieglikozykowane przeciwciała blokujące receptory epidermalnego czynnika wzrostu komórki [63]. Wykazano, że modyfikowane przeciwciała wykazują farmakokinetykę i biodystrybucję porównywalną z odpowiednikami pochodzącymi z komórek ssaków. Nimotuzumab dopuszczono do stosowania w wielu krajach azjatyckich (Tajlandia, Birma, Kambodża, Indonezja, Filipiny) w terapii wysoko złośliwego glejaka oraz w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi. Opisano też ekspresję trastuzumabu, rekombinowanego, humanizowanego przeciwciała monoklonalnego klasy Ig1, które wybiórczo łączy się z receptorem naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2) [37]. Przeciwciała te wykorzystano w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptorowego białka HER2 lub amplifikacją genu HER2. Uzyskany trastuzumab pochodzący z roślin (PMT) wykazywał spowalnianie wzrostu komórek ludzkiego raka jajnika SKOV3 Her2+ [38].

Szczepionki

Choroby zakaźne pozostają ogromnym problemem dzisiejszego świata. Każdego roku prawie jedna trzecia wszystkich zgonów jest spowodowana przez różnorodne czynniki zakaźne. Szacuje się, że ponad 15 z 57 milionów zgonów rocznie ma bezpośrednie powiązanie z chorobami zakaźnymi [54]. Szczepienia, zapewniając masową profilaktykę, ciągle pozostają jednym z bardziej skutecznych działań w zakresie ochrony zdrowia. Dzięki nim wyeliminowano lub znacznie ograniczono wpływ licznych chorób zakaźnych, znacząco zwiększyło to długość życia i poprawiło jego jakość. Jednocześnie jednak koszty szczepień nadal pozostają wysokie, co jest szczególnie dotkliwe w społeczeństwach krajów rozwijających się. Potrzeba uproszczenia dotychczasowych procedur uzyskiwania szczepionek i związana z tym szansa obniżenia rosnących kosztów produkcji skłoniły badaczy do poszukiwań alternatywnych strategii wobec metod tradycyjnych [86]. Dzięki tym potrzebom powstała koncepcja wykorzystania do tego celu roślin.

Z perspektywy minionych lat wydaje się, że uzyskiwanie szczepionek tym sposobem jest jedną z bardziej spektakularnych możliwości wykorzystania roślin do produkcji rekombinowanych białek. Poza wymienionymi wcześniej czynnikami preferującymi systemy roślinne, w przypadku szczepionek pochodzenia roślinnego, warto wymienić możliwość wykorzystania jadalnych części roślin jako szczepionki doustnej. Istotną rolę odegrać powinna też powszechna dostępność, łatwość transportu i przechowywania takich szczepionek, bez konieczności korzystania z pomocy kwalifikowanego personelu medycznego. Dla milionów ludzi, głównie w ubogich krajach afrykańskich i azjatyckich, gdzie zapotrzebowanie na szczepienia jest największe, mogą stanowić wielką nadzieję [33].

Rośliny mogą pełnić rolę bioreaktorów, a dzięki zastosowaniu technologii inżynierii genetycznej doprowadzić w nich można do profilowanej odpowiedzi immunologicznej. Historia badań nad białkami pochodzenia roślinnego mogącymi pełnić rolę szczepionek (plant-derived vaccine) ma wieloletnią tradycję. Lista takich preparatów uzyskiwanych w laboratoriach jest niezwykle bogata (tab. 3). Obejmuje wiele peptydów wywołujących bezpośrednią odpowiedź immunologiczną, takich jak konwencjonalne szczepionki bądź zwiększające immunogenność po właściwym szczepieniu. Liczba gatunków, w których podjęto próby wytwarzania takich białek jest znacząca (m.in. pomidor, ziemniak, banan, marchew, sałata, ryż), a pozycję lidera zajmuje tytoń, modelowa roślina w tym profilu badań. Nie wszystkie gatunki okazały się odpowiednie do produkcji szczepionek. Na podstawie zdobytych doświadczeń uzasadnione nadzieje budzą np. sałata czy marchew, które można spożywać na surowo (wykorzystane np. do wytwarzania antygeny wirusa zapalenia wątroby typu B, dopuszczonego do badań przedklinicznych). Udane próby przeprowadzono na ryżu, którego zaletą, poza powszechną obecnością w diecie milionów ludzi, jest też gromadzenie rekombinowanego białka w nasionach i możliwości umiejscowienia rekombinowanego białka w nasionach, co ze względu na małą aktywność proteaz zapewnia im doskonałe warunki przechowywania [33]. Właśnie w ryżu z powodzeniem wyprodukowano kilka antygenów w tym m.in. białko otoczki wirusa zapalenia mózgu (VEP), które użyte jako szczepionki dawały wyższy poziom immunoglobulin IgG i IgA, niż odpowiedź na tradycyjne, rekombinowane białko pochodzące z *E. coli* [84].

Szczepionki w postaci podjednostek rozmaitych białek pełniących rolę antygenów czy ich epitopów mogą wywoływać kompleksową reakcję organizmu w postaci zarówno tzw. odpowiedzi miejscowej (generują przeciwciała IgA w błonach śluzowych), jak i systemicznej, tj. wytwarzanie przeciwciał głównie klasy IgG we krwi. Odnotowano, że w przypadku szczepionki przeciwko wirusowi *polio*, dochodzi dodatkowo do indukcji reakcji cytotoksycznej limfocytów skierowanych do zwalczania komórek zakażonych wirusem.

Różnorodność patogenów, przeciwko którym mogą być wykorzystywane szczepionki pochodzenia roślinnego jest bardzo duża i obejmuje choroby pochodzenia bakteryjnego, wirusowego czy te wywoływane przez pierwotniaki. Uzasadnione nadzieje budzą też w terapii nowotworowej czy cukrzycy (szacuje się, że około 15% raka żołądka, wątroby czy szyjki macicy powodują zakaźne mikroorganizmy), a także w indywidualizacji terapii [1].

W pracach nad omawianymi białkami stosunkowo długo poważnym ograniczeniem był niski poziom ich ekspresji w systemach roślinnych (nie przekraczał granicy 0,1- 0,2% TSP). Oparte były głównie na genomach jądrowych [28,35,51]. Zdobywane doświadczenia pozwoliły na pokonanie tej bariery i obecnie wiele białek jest wytwarzanych ze znacznie lepszą wydajnością sięgającą kilku-kilkunastu procent TSP. Przykładami są m.in. błonowe antygeny przeciw cholerze

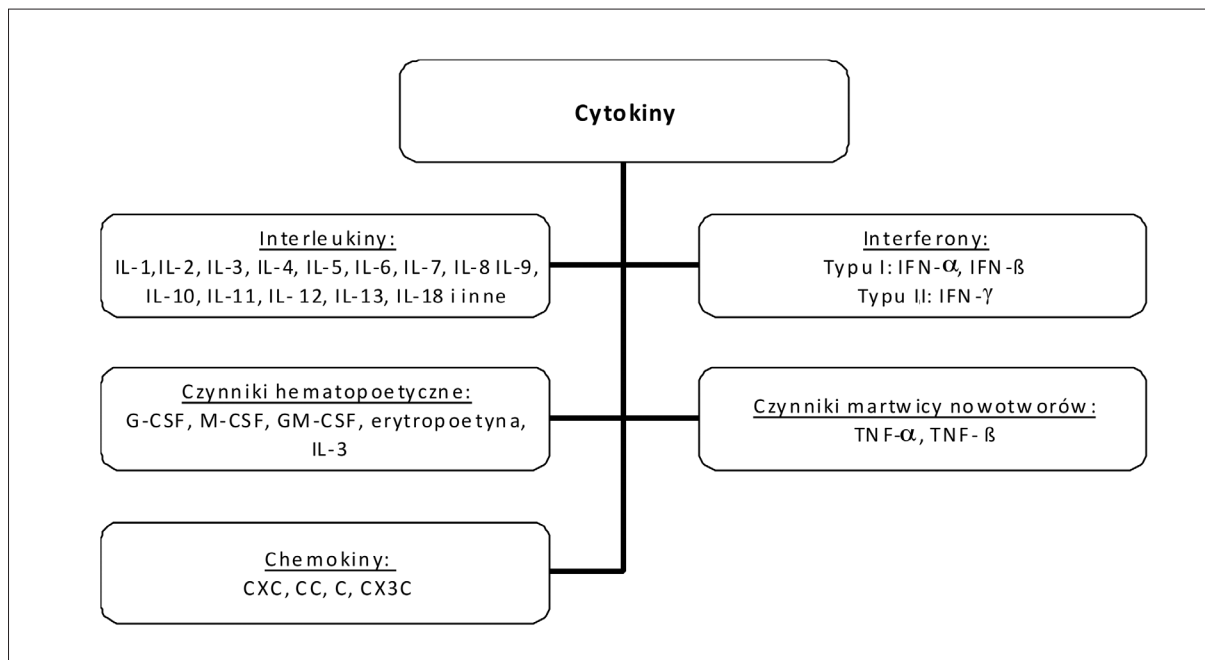
Tabela 3 . Wybrane przykłady szczepionek, których ekspresję uzyskano w roślinach

Tworzone na bazie genomów jądrowych przeciw chorobom			
Bakteryjnym			
Antygen	Roślina/poziom ekspresji % TSP*	Choroba	Piśmiennictwo
podjedn. B termolabilnej enterotoksyny <i>E.coli</i> (LT-B)	marchew /0,3%	biegunka	[64]
peptyd PA toksyny <i>Bacillus anthracis</i>	tytoń/b.d.	wąglik	[5]
podjednostka B toksyny <i>Vibrio cholerae</i> (CTB)	ryż	cholera	[60]
DTP – kombinacja antygenów toksyn <i>Diphtheria, Tetanus, Pertussis</i>	tytoń/0,15%	błonica tężec, krztusiec	[8]
Wirusowym			
antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby Typu B (HbsAG)	m.in. pomidor/0.85%	zapalenie wątroby typu B	[77]
białko kapsydu rotawirusa (VP6)	ziemniak/0,4%	ostra biegunka	[53]
białko CoV wirusa SARS	pomidor, tytoń/0,1%	zespół ostrej niewydolności oddechowej	[13]
glikoproteina B cytomegalowirusa (HCMV)	Tytoń/0,14%	choroba central. ukł. nerw.	[75]
Tworzone na bazie genomów chloroplastowych przeciw chorobom			
Bakteryjnym			
białko OspA, OspA-T <i>Borellia burgdorferi</i>	tytoń/10%	borelioza	[23]
białko B toksyny (CtxB) <i>Vibrio cholerae</i>	sałata 9,4%	cholera	[61]
białko fuzyjne CaF1-LcrV wirusa <i>Yersinia pestis</i>	tytoń/14,8%	dżuma płucna	[4]
Wirusowe			
białko L1 wirusa HPV	tytoń/26%	brodawczak ludzki	[18]
białko HEV E2 wirusa zapalenia wątroby typu E	tytoń/b.d.	zapalenie wątroby typu E	[90]
p24-Nef - białko fuzyjne wirusa HIV	tytoń/40%	AIDS	[89]
Pierwotniakowym			
białko fuzyjne CTBama1-CTBmsp1	tytoń/12,3%	malaria	[61]

*TSP- całkowite białko rozpuszczalne

i malarii czy podjednostka proinsuliny ludzkiej (białka fuzyjne odpowiednio: CTB:ama-1, CTB-msp-1 i CTB:Pins) [14,66]. Korzystne działanie osiągnięto wieloma sposobami, m.in. przez dobór odpowiednich promotorów, konkretnego osobnika czy organu. Jednak główną rolę odegrało wykorzystanie chloroplastów jako miejsca docelowej ekspresji białek.

Transplastomiczne podejście wydaje się obiecującą strategią, pozwala bowiem na uzyskanie bardzo dużej wydajności (> 10% TSP) [10]. Plastydy nie są oczywiście systemem idealnym (nie zachodzi tu np. tzw. potranslacyjna obróbka białek złożonych nadająca części z nich finalną aktywność biologiczną), niemniej lista oraz różnorodność antygenów



Ryc. 1. Podział cytokin ze względu na pełnione funkcje komórkowe (wg [76], zmodyfikowano)

uzyskiwanych tym sposobem jest dziś długa. Poza wymienionymi wyżej pozytywne wyniki uzyskano także dla antygenów przeciw pałeczkom dżumy *Yersinia pestis* [4], antygenów HIV-1 [89], antygenów OspA, OspA-T przeciw boreliozie [23], antygeny Pag przeciw laseczkom wąglika *Bacillus anthracis* [39] oraz antygenów L1 przeciw wirusowi brodawczaka ludzkiego HPV [18]. W większości przypadków do tego celu wykorzystywano chloroplasty tytoniu, lecz zadowalające wyniki uzyskano także w przypadku sałaty i glonu *Chlamydomonas reinhardtii* [66,83].

Poszukiwania optymalnych warunków do wysokiej i stabilnej ekspresji omawianych białek nie ograniczały się do wykorzystania genomów jądrowego czy chloroplastowego. Podejmowano próby transformacji trwałej (stable transformation) wykorzystującej zwykle mechanizm agroinfekcji bądź transformacji przejściowej (transient transformation) infekując rośliny rekombinowanymi wirusami czy szczepami *A.tumefaciens* (jej modyfikacją jest wydajna magnifekcja) [22]. Jedną z zalet drugiego z wymienionych modeli okazał się krótki czas niezbędny do uzyskania wyników, czyli ekspresji antygenów (kilka-kilkaście dni wobec kilkunastu miesięcy w przypadku transformacji trwałej) [9].

Ciekawym nurtem, a jednocześnie nowym etapem w rozwoju szczepionek roślinnych stała się możliwość konstrukcji i wykorzystania chimericznych białek. Tym sposobem uzyskiwano skuteczne szczepionki o podwójnym działaniu, jak np. przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B i zespołowi nabytego niedoboru odporności (AIDS). Shchelkunov i wsp. opisał wytwarzanie w pomidorze fuzyjnego peptydu HBS-TBI zawierającego powierzchniowe białko wirusa zapalenia wątroby typu B (HBS) i epitopy *env* i *gag* ludzkiego wirusa niedoboru odporności (TBI), a podawanie myszom

pokarmu z suszonymi pomidorami zawierającymi to białko wywołało u nich wyraźną odpowiedź immunologiczną, zarówno w surowicy jak i w błonie śluzowej [71]. Jako rodzaj platformy fuzyjnej stosowano też model VLP (virus-like particles) oparty o wykorzystanie cząsteczek wirusopodobnych. Strategię wykorzystywano w produkcji heterologicznych antygenów jako szczepionki przeciw HIV. Spektakularnym przykładem jest peptyd zawierający osiem epitopów białek *gag* i *pol* z HIV-1 tworzących fuzyję z białkiem powierzchniowym wirusa HBV w celu wytworzenia HIV-1-HBV VLP. Zadawalający poziom ekspresji takiego zrekombinowanego białka uzyskano w *N. tabacum* i *A.thaliana* [25].

Zainteresowanie badaczy tym kierunkiem badań jest duże i stale rośnie, a przykładami szczepionek pochodzenia roślinnego, które pomyślnie przeszły etap badań klinicznych są dziś m.in.: antygen powierzchniowy HbsAg wirusa zapalenia wątroby typu B, podjednostka B termolabilnej enterotoksyny z *E.coli* wywołująca biegunkę, glikoproteina wirusa wścieklizny czy jednołańcuchowy peptyd Fv przeciw chłoniakowi niezmierniczemu (NHL) [87].

Cytokiny

Cytokiny to największa i najbardziej heterogenna grupa omawianych białek. Tworzą ją rozpuszczalne, niewielkie glikoproteiny będące składnikiem układu odpornościowego człowieka. Wytwarzane są głównie w leukocytach, lecz ich obecność potwierdzono także w fibroblastach i komórkach śród błonka [76]. Kontrolują tak ważne procesy jak m.in. odporność wrodzoną i nabytą, procesy hematopoetyczne czy zapalne. Cytokiny oddziałują zarówno na komórki, które je wydzielają oraz te znajdujące się w bezpośrednim ich sąsiedztwie, jak również na komórki

innych narządów (działanie autokrynowe, parakrynowe i endokrynowe). Mogą być wydzielane zarówno podczas odpowiedzi immunologicznej organizmu, jak i podczas zdarzeń nieimmunologicznych.

Związki tej grupy łączą trzy podstawowe cechy: plejotropia, tj. zdolność do oddziaływania na różne typy komórek, redundancja - wywoływanie tego samego skutku przez różne typy cytokin oraz „multifunkcjonalność” tj. możliwość regulowania różnych funkcji immunologicznych przez tę samą cytokinę [76]. Działają za pośrednictwem receptorów, których zewnątrzkomórkowe domeny, odpowiadają za swoistość wiązanych przez nie ligandów i regulują przekaz sygnału już po związaniu się z odpowiednią cytokiną.

Wcześniejsze opracowania, uwzględniając rodzaj komórek wydzielających cytokiny dzieliły je na: limfokiny (wydzielane przez limfocyty) i monokiny (makrofagi i monocyty). Nowsze podziały, uwzględniają funkcje pełnione przez grupy cytokin i wyróżniają wśród nich: interleukiny, chemokiny, interferon, czynniki hematopoetyczne oraz czynniki martwicy nowotworów (ryc.1) [76].

Rezultaty licznych badań potwierdziły skuteczność cytokin w leczeniu raka, chorób autoimmunologicznych czy podczas infekcji [79]. Pozytywne wyniki testów klinicznych sprawiły, że wiele tych związków dopuszczono do użycia, a pierwszym z nich był interferon [76]. Inne przykłady cytokin zarejestrowanych jako leki to: Intron A, Imukin oraz Proleukine [24]. Problemami, ograniczającymi szersze ich zastosowanie są wysokie koszty produkcji (w tym oczyszczenia), a także to, że większość komercyjnie dostępnych cytokin jest wytwarzana w komórkach *E.coli*, co pozbawia je istotnego wyniku glikozylacji. Wady tej są pozbawione systemy roślinne. Ponadto, podobnie jak w przypadku innych rekombinowanych białek, rośliny i tu stwarzają nadzieję taniej produkcji, nietoksycznych cytokin [79].

W dalszej części pracy, eksponując rolę systemów roślinnych wykorzystywanych do ekspresji, zaprezentowano przykłady wybranych cytokin, reprezentujących kilka podstawowych grup.

Interleukiny

Klasę tę tworzą liczne rodziny białek zaangażowanych w procesy regulacji odpowiedzi immunologicznej, indukcji proliferacji komórek NK, limfocytów T i B czy stany zapalne i hematopoetyczne [44]. Interleukiny znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu takich schorzeń jak: choroba Crohna, zapalenie kości i stawów, astma, łuszczyca, czerniak [24]. Przykładem komercyjnie dostępnych interleukin jest m.in. Oprelvekin (Neumega), będący postacią rekombinowanej ludzkiej IL-11, którą od naturalnej IL-11 różni brak wspomnianej glikozylacji.

Jednym z pierwszych białek tej klasy wytwarzanych w systemach roślinnych były IL-2 i IL-4. Ich ekspresję

uzyskano w 1998 r. w kulturze zawiesinowej tytoniu, niestety jej wydajność była niezadowolająca (0,10 i 0,18 µg/ml) [49]. Obecna skuteczność jest znacząco lepsza. Przykładem jest nadmierne wytwarzanie IL-10 z wykorzystaniem wektora z promotorem glutelinowym i jej gromadzenie w ziarniakach ryżu. Opisaną interleukinę, w postaci niekowalencyjnych dimerów, cechowała 10-krotnie większa aktywność niż komercyjne preparaty otrzymywane z *E. coli*. Zaletą „roślinnej” IL-10 było też znikome zanieczyszczenie endotoksynami, co stwarza szerokie możliwości klinicznego jej stosowania [19].

Czynniki hematopoetyczne

Erytropoetyna, hormon wytwarzany w nerkach, który znacząco wpływa na tworzenie czerwonych krwinek, jest stosowany podczas leczenia anemii oraz chorób nerek. Najnowsze badania wykazały, że systematyczne podawanie wysokich dawek hormonu zwiększa też regenerację wątroby [26] oraz wpływa na regenerację kości związaną z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi [55]. Prace Matsumoto i wsp. zapoczątkowały rozwój badań nad otrzymywaniem ludzkiej erytropoetyny w systemach roślinnych [52]. Ekspresję tego białka uzyskano m.in. w komórkach tytoniu (*N. benthamiana*) transformowanych *A.tumefaciens*, gdzie jednoczesna koekspresja ludzkich genów odpowiedzialnych za przyłączenie grupy sialowej, pozwoliła zwiększyć stabilność rekombinowanej erytropoetyny (rhEPO). Uzyskany produkt stanowił około 2% wszystkich rozpuszczalnych białek, podczas gdy we wcześniejszych pracach wydajność była stokrotnie niższa [36].

Ciekawy przykład zwiększania ekspresji białek w systemie roślinnym opisano na podstawie wytwarzania czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Początkowo był produkowany w komórkach zawiesinowych tytoniu transformowanych z użyciem wektora pod kontrolą promotora CaMV 35S. Maksymalne stężenie GM-CSF jakie uzyskiwano sięgało 0,5% wydzielonych białek [34]. Dodanie do podłoża polimerów stabilizujących (głównie żelatynę) zapobiegających skutkom degradacji GM-CSF, doprowadziło do niemal 3-krotnego wzrostu poziomu ekspresji tego białka [42]. Najlepsze rezultaty uzyskano w kulturach zawiesinowych ryżu (aż 25% wszystkich wydzielanych białek), stosując transformację z użyciem wektora pod kontrolą amylazowego promotora 3D [72].

Interferony

Interferony α , β , γ zależnie od typu, są wydzielane odpowiednio przez monocyty, fibroblasty i limfocyty T, co stanowi odpowiedź na infekcje wirusowe. Zakres ich aktywności obejmuje hamowanie proliferacji komórek, regulowanie wytwarzania przeciwciał przez limfocyty B oraz wzmaganie fagocytozy. Jako terapeutyki są często stosowane w leczeniu chorób nowotworowych nerki, pęcherza, jajnika oraz podczas leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu B osób zakażonych wirusem HPV.

W początkach lat 90 XX w. podjęto próby uzyskania ekspresji interferonu w komórkach roślinnych. Sukcesem było otrzymanie IFN- α po transformacji protoplastów ryżu metodą lipofekcji [91]. Wykazano jednocześnie, że transformacja chloroplastów może wywołać bardzo wysoką ekspresję interferonu, co potwierdzono na przykładzie tytoniu wytwarzającego IFN- α 2b na poziomie 20% wszystkich rozpuszczalnych białek (hodowlę prowadzono też w warunkach polowych). Aktywność uzyskanego interferonu była porównywalna do komercyjnie dostępnego preparatu PEG-Intron™. Chronił on komórki przed replikacją wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej oraz hamował wczesne fazy infekcji wirusa HIV [3]. Wielokrotnie otrzymano ekspresję interferonu w różnych gatunkach roślin m.in.: w marchwi (*Daucus carota*), w kapuście rzepak (*Brassica napus*), a także w aloesie (*Aloe vera*) [45,46,69].

Czynnik martwicy nowotworów

TNF, czynnik martwicy nowotworów jest wytwarzany głównie przez monocyty i makrofagi. Stymuluje cytotoxicytność i proliferację komórek NK, pobudza wydzielanie wielu innych cytokin i ma działanie antynowotworowe, a wraz z IL-2, zwiększa cytotoxicytność monocytów i makrofagów. Literatura naukowa poruszająca problem ekspresji TNF w systemach roślinnych nie jest tak bogata jak w przypadku wcześniej omawianych cytokin, niemniej, udaną próbę opisano w ziemniaku (*Solanum tuberosum*) transformowanego dwoma różnymi konstrukcjami. Pierwszy, zawierał m.in. promotor CaMV 35S oraz wzmacniacz translacji TMV Ω , drugi był dodatkowo wzbogacony na końcu 5' o sekwencję nukleotydową z genu kodującego leguminę oraz sekwencję SEKDEL na końcu 3'. Działania miały na celu zwiększenie stabilności produktu w komórkach roślinnych, uzyskane wyniki nie były jednak zadowalające. Poziom ekspresji TNF- α otrzymany w ziemniaku wydaje się jednak wystarczający do wykorzystania takiego systemu do zastosowań klinicznych [58].

Przytoczone przykłady uzyskania ekspresji różnych cytokin w systemach roślinnych budzą uzasadnione nadzieje badaczy. Podobnie jak w przypadku innych omawianych białek, również tutaj istnieje pełna świadomość wyzwań i problemów, które nie zostały do tej pory skutecznie rozwiązane. Wymienić należy problem stabilnej i dobrej wydajności wytwarzania, aktywności białek czy doboru odpowiedniego i taniego sposobu oczyszczania produktu finalnego. Poważną przeszkodą wydają się także problemy natury prawnej [73], co najpełniej znajduje odbicie w tym, że żadna z cytokin nie została zaakceptowana przez FDA w latach 2008-2011 [74].

PODSUMOWANIE

Z organizmami GM, których genom zostaje zmieniony w celu uzyskania nowych właściwości, wiąże się zarówno wielkie nadzieje (zwłaszcza w biologii i medycynie), jak i obawy, zwłaszcza dotyczące niekorzystnych skutków dla rolnictwa i środowiska.

Niekwestionowane zalety roślin, jako potencjalnych producentów różnorodnych białek o charakterze terapeutycznym, potwierdzone mnogością udanych eksperymentów, kontrastują obecnie z liczbą tych, które przeszły z powodzeniem etap badań klinicznych. Jednoznaczne zdefiniowanie przyczyn nie jest łatwe, wydaje się, że większe koncerny farmaceutyczne są zainteresowane raczej produktami przeznaczonymi dla zwierząt [7]. Produkcja rekombinowanych białek w roślinach/komórkach roślinnych jest tania, w związku z tym ewentualne dochody mogą się okazać zbyt niskie, żeby były opłacalne dla dużych firm biotechnologicznych.

Istotnym czynnikiem tłumaczącym limitowane wykorzystanie roślin GM jest, niezwykle złożona, ścieżka legislacyjna. Podstawowe znaczenie mają normy międzynarodowe, a najważniejszymi aktami prawa związanymi z GMO są Konwencja z Rio de Janeiro z 1992 r. (do polskiego porządku prawnego wprowadzona 10 lat później) oraz dołączony do niej Protokół z Kartagenu. Są podstawą wielu aktów prawnych wydanych przez Polskę i Unię Europejską. Każdego roku akty te wzbogacane są w nowe dyrektywy i rozporządzenia. Wśród nich wymienia się m.in. Rozporządzenie 726/2004/WE ustanawiające wspólnotowe procedury wydawania pozwoleń dla produktów leczniczych stosowanych u ludzi i nadzoru nad nimi. Inne akty to Dyrektywa 98/44/WE w sprawie ochrony prawnej wynalazków biotechnologicznych czy Dyrektywa 2001/83/EC dotycząca rekombinowanych białek uzyskiwanych z transgenicznych roślin w Europie i podlegające wytycznym Europejskiej Agencji Leków. Produkcję biofarmaceutyków w całych roślinach lub w systemach komórek roślinnych (uprawy zamknięte) reguluje Dyrektywa 2009/41/EC. Przygotowywanie wspomnianych dokumentów zajęło kilkanaście lat z powodu wielu wątpliwości o charakterze politycznym, prawnym, ekonomicznym i etycznym związanymi z patentowaniem wynalazków biotechnologicznych.

Substancje o właściwościach leczniczych składające się z GMO lub je zawierające muszą przejść procedury dopuszczania ich na rynek, podobnie jak leki niezawierające GMO. Przed dopuszczeniem do obrotu środków leczniczych, należy uzyskać zgodę na uwolnienie GMO do środowiska zgodnie z regulacjami części B Dyrektywy 2001/18.

Praca dotyczy wykorzystania roślin (komórek roślinnych), jako potencjalnego źródła pozyskiwania białek terapeutycznych i w tym kontekście można mówić o zamkniętym charakterze zastosowania GMO, rozumianym jako każde działanie, które ma na celu modyfikację genetyczną organizmów oraz dokładny tok postępowania, tj. warunki hodowli, przechowywania, transportu. Podczas wszystkich tych procesów muszą być zastosowane specjalne zabezpieczenia w celu zminimalizowania kontaktu GMO z ludźmi i środowiskiem. Oznacza to, że każde doświadczenie przeprowadzane w laboratoriach naukowych, musi być zgłoszone i podlega dalszym procedurom.

W Polsce, podstawowym aktem prawnym normującym sprawy organizmów genetycznie modyfikowanych jest ustawa z 22.06.2001 r. o organizmach genetycznie modyfikowanych (weszła w życie 26.10.2001), która obejmuje m.in. zamknięte użycie organizmów genetycznie zmodyfikowanych. Na podstawie tej ustawy zostały wydane liczne akty wykonawcze.

Powyższy opis, w niewielkim stopniu, oddaje skalę złożoności omawianego problemu i wydaje się wielce prawdopodobne, że właśnie to może być ważnym czynnikiem spowalniającym proces pojawienia się wielu opisywanych w artykule substancji jako oferty rynku farmaceutycznego. Niemniej, zebrane różnorodne doświadczenia pozwalają mieć nadzieję, że w niedległej przyszłości sytuacja ulegnie korzystnej zmianie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahmad P., Ashraf M., Younis M., Hu X., Kumar A., Arkam N.A., Al-Qurainy F.: Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnol. Adv.*, 2012; 30: 524-540
- [2] Almquist K.C., McLean M.D., Niu Y., Byrne G., Olea-Popelka F.C., Murrant C., Barclay J., Hall J.C.: Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. *Vaccine*, 2006; 24: 2079-2086
- [3] Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S., Cole A., Cole A.M., Oishi K.K., Daniell H.: Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b. *Plant Biotechnol. J.*, 2007; 5: 511-525
- [4] Arlen P.A., Singleton M., Adamovics J.J., Ding Y., Davoodi-Semiromi A., Daniell H.: Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect. Immun.*, 2008; 76: 3640-3650
- [5] Aziz M.A., Singh S., Anand Kumar P., Bhatnagar R.: Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 299: 345-351
- [6] Bouquin T., Thomsen M., Nielsen L.K., Green T.H., Mundy J., Dziegiel M.H.: Human anti-rhesus D IgG1 antibody produced in transgenic plants. *Transgenic Res.*, 2002; 11: 115-122
- [7] Brodzik R., Glogowska M., Bandurska K., Okulicz M., Deka D., Ko K., van der Linden J., Leusen J.H., Pogrebnyak N., Golovkin M., Stepkowski Z., Koprowski H.: Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 8804-8809
- [8] Brodzik R., Spitsin S., Pogrebnyak N., Bandurska K., Portocarrero C., Andryszak K., Koprowski H., Golovkin M.: Generation of plant-derived recombinant DTP subunit vaccine. *Vaccine*, 2009; 27: 3730-3734
- [9] Budzianowski J.: Tytoń – wysokowydajny producent szczepionek. *Przegl. Lek.*, 2010; 67: 1071-1076
- [10] Cardi T., Lenzi P., Maliga P.: Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 2010; 9: 893-911
- [11] Carter P.J.: Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 6: 343-357
- [12] Chen H., Shaffer P.L., Huang X., Rose P.E.: Rapid screening of membrane protein expression in transiently transfected insect cells. *Protein Expr. Purif.*, 2013; 88: 134-142
- [13] Daniell H., Singh N.D., Mason H., Streatfield S.J.: Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.*, 2009; 14: 669-679
- [14] Davoodi-Semiromi A., Schreiber M., Nalapalli S., Verma D., Singh N.D., Banks R.K., Chakrabarti D., Daniell H.: Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol. J.*, 2010; 8: 223-242
- [15] De Neve M., De Loose M., Jacobs A., Van Houdt H., Kaluza B., Weidle U., Van Montagu M., Depicker A.: Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res.*, 1993; 2: 227-237
- [16] De Wilde C., De Neve M., De Rycke R., Bruyns A.M., De Jaeger G., Van Montagu M., Depicker A., Engler G.: Intact antigen-binding MAK33 antibody and F_{ab} fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, 1996; 114: 233-241
- [17] Desai P.N., Shrivastava N., Padh H.: Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnol. Adv.*, 2010; 28: 427-435
- [18] Fernandez-San Millan A., Ortigosa S.M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J.M., Gaétan J., Coursaget P., Veramendi J.: Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.*, 2008; 6: 427-441
- [19] Fujiwara Y., Aiki Y., Yang L., Takaiwa F., Kosaka A., Tsuji N.M., Shiraki K., Sekikawa K.: Extraction and purification of human interleukin-10 from transgenic rice seeds. *Protein Expr. Purif.*, 2010; 72: 125-130
- [20] Girard L.S., Fabis M.J., Bastin M., Courtois D., Pétiard V., Koprowski H.: Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 345: 602-607
- [21] Giritch A., Marillonnet S., Engler C., van Eldik G., Botterman J., Klimyuk V., Gleba Y.: Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 14701-14706
- [22] Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S.: Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 2005; 23: 2042-2048
- [23] Glenz K., Bouchon B., Stehle T., Wallich R., Simon M.M., Warzecha H.: Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nat. Biotechnol.*, 2006; 24: 76-77
- [24] Góra-Sochacka A., Radkiewicz P., Napiórkowska B., Sirko A.: Wykorzystanie systemów roślinnych do produkcji rekombinowanych cytokin. *Post. Biochem.*, 2009; 55: 85-94
- [25] Greco R., Michel M., Guetard D., Cervantes-Gonzalez M., Pelucchi N., Wain-Hobson S., Sala F., Sala M.: Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. *Vaccine*, 2007; 25: 8228-8240
- [26] Gul M., Cömert M., Çakmak G.K., Kurtis G., Ugurbas E., Oner M.O.: Effect of erythropoietin on liver regeneration in an experimental model of partial hepatectomy. *Int. J. Surg.*, 2013; 11: 59-63
- [27] Hamorsky K.T., Grooms-Williams T.W., Husk A.S., Bennett L.J., Palmer K.E., Matoba N.: Efficient single tobamovirus vector-based bioproduction of broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody VRC01 in *Nicotiana benthamiana* plants and utility of VRC01 in combination microbicides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013; 57: 2076-2086
- [28] Haq T.A., Mason H.S., Clements J.D., Arntzen C.J.: Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 1995; 268: 714-716
- [29] Hassaine G., Deluz C., Tol M.B., Li X.D., Graff A., Vogel H., Nury H.: Large scale expression and purification of the mouse 5-HT3 receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1828: 2544-2552

- [30] He J., Lai H., Brock C., Chen Q.: A novel system for rapid and cost-effective production of detection and diagnostic reagents of West Nile virus in plants. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, 2012: 1-10
- [31] Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K.: Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989; 342: 76-78
- [32] Hiatt A., Pauly M.: Monoclonal antibodies from plants: a new speed record. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 14645-14646
- [33] Horn M.E., Woodard S.L., Howard J.A.: Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep.*, 2004; 22: 711-720
- [34] James E.A., Wang C., Wang Z., Reeves R., Shin J.H., Magnuson N.S., Lee J.M.: Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr. Purif.*, 2000; 19: 131-138
- [35] Jani D., Meena L.S., Rizwan-ul-Haq Q.M., Singh Y., Sharma A.K., Tyagi A.K.: Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.*, 2002; 11: 447-454
- [36] Jez J., Castillo A., Grass J., Vorauer-Uhl K., Sterovsky T., Altmann F., Steinkellner H.: Expression of functionally active sialylated human erythropoietin in plants. *Biotechnol. J.*, 2013; 8: 371-382
- [37] Kolenda P., Litwiniuk M.: Kontynuacja terapii trastuzumabem po operacyjnym leczeniu przerzutu do mózgu – opis przypadku. *Wsp. Onkol.*, 2010; 14: 393-396
- [38] Komarova T.V., Kosorukov V.S., Frolova O.Y., Petrunia I.V., Skrypnik K.A., Gleba Y.Y., Dorokhov Y.L.: Plant-made trastuzumab (herceptin) inhibits HER2/Neu+ cell proliferation and retards tumor growth. *PLoS One*, 2011; 6: e17541
- [39] Koya, V., Moayeri M., Leppla S.H., Daniell H.: Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 8266-8274
- [40] Lai H., Engle M., Fuchs A., Keller T., Johnson S., Gorlatov S., Diamond M.S., Chen Q.: Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 2419-2424
- [41] Leader B., Baca Q.J., Golan D.E.: Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008; 7: 21-39
- [42] Lee J.H., Kim N.S., Kwon T.H., Jang Y.S., Yang M.S.: Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *J. Biotechnol.*, 2002; 96: 205-211
- [43] Lee J.H., Park D.Y., Lee K.J., Kim Y.K., So Y.K., Ryu J.S., Oh S.H., Han Y.S., Ko K., Choo Y.K., Park S.J., Brodzik R., Lee K.K., Oh D.B., Hwang K.A., Koprowski H., Lee Y.S., Ko K.: Intracellular reprogramming of expression, glycosylation, and function of a plant-derived antiviral therapeutic monoclonal antibody. *PLoS One*, 2013, 8: e68772
- [44] Lewko W.M., Oldham R.K.: Cytokines, W: Principles of Cancer Biotherapy, red.: Oldham R.K., Dillman R.O., Springer Netherlands, Nowy Jork, 2009, 155-276
- [45] Lowther W., Lorick K., Lawrence S.D., Yeow W.S.: Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera*. *Transgenic Res.*, 2012; 21: 1349-1357
- [46] Luchakivskaya Y., Kishchenko O., Gerasymenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Y., Spivak M., Kuchuk M.: High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants. *Plant Cell Rep.*, 2011; 30: 407-415
- [47] Łoś J.M., Węgrzyn G.: Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC) i bakteriofagi kodujące toksyny Shiga. *Post. Mikrobiol.*, 2011; 50: 175-190
- [48] Łoś-Rycharska E., Czerwionka-Szaflarska M.: Biegunki rotawirusowe – dlaczego warto im zapobiegać. *Prz. Gastroenterol.*, 2011; 6: 60-68
- [49] Magnuson N.S., Linzmaier P.M., Reeves R., An G., HayGlass K., Lee J.M.: Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr. Purif.*, 1998; 13: 45-52
- [50] Mahmoud K.: Recombinant protein production: strategic technology and a vital research tool. *Res. J. Cell Mol. Biol.*, 2007; 1: 9-22
- [51] Mason H.S., Haq T.A., Clements J.D., Arntzen C.J.: Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, 1998; 16: 1336-1343
- [52] Matsumoto S., Ishii A., Ikura K., Ueda M., Sasaki R.: Expression of human erythropoietin in cultured tobacco cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993; 57: 1249-1252
- [53] Matsumura T., Itchoda N., Tsunemitsu H.: Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch. Virol.*, 2002; 147: 1263-1270
- [54] Morens D.M., Folkers G.K., Fauci A.S.: The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, 2004; 430: 242-249
- [55] Nair A.M., Tsai Y.T., Shah K.M., Shen J., Weng H., Zhou J., Sun X., Saxena R., Borrelli J.Jr., Tang L.: The effect of erythropoietin on autologous stem cell-mediated bone regeneration. *Biomaterials*, 2013; 34: 7364-7371
- [56] Nakanishi K., Narimatsu S., Ichikawa S., Tobisawa Y., Kurohane K., Niwa Y., Kobayashi H., Imai Y.: Production of hybrid-IgG/IgA plantibodies with neutralizing activity against Shiga toxin 1. *PLoS One*, 2013; 8: e80712
- [57] O'Hara J.M., Whaley K., Pauly M., Zeitlin L., Mantis N.J.: Plant-based expression of a partially humanized neutralizing monoclonal IgG directed against an immunodominant epitope on the ricin toxin A subunit. *Vaccine*, 2012; 30: 1239-1243
- [58] Ohya K., Itchoda N., Ohashi K., Onuma M., Sugimoto C., Matsumura T.: Expression of biologically active human tumor necrosis factor-alpha in transgenic potato plant. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2002; 22: 371-378
- [59] Olinger G.G.Jr., Pettitt J., Kim D., Working C., Bohorov O., Bratcher B., Hiatt E., Hume S.D., Johnson A.K., Morton J., Pauly M., Whaley K.J., Lear C.M., Biggins J.E., Scully C., Hensley L., Zeitlin L.: Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109: 18030-18035
- [60] Oszvald M., Kang T.J., Tomoskozi S., Jenes B., Kim T.G., Cha Y.S., Tamas L., Yang M.S.: Expression of cholera toxin B subunit in transgenic rice endosperm. *Mol. Biotechnol.*, 2008; 40: 261-268
- [61] Pogrebnyak N., Markley K., Smirnov Y., Brodzik R., Bandurska K., Koprowski H., Golovkin M.: Collard and cauliflower as a base for production of recombinant antigens. *Plant Sci.*, 2006; 171: 677-685
- [62] Ramessar K., Rademacher T., Sack M., Stadlmann J., Platis D., Stiegler G., Labrou N., Altmann F., Ma J., Stöger E., Capell T., Christou P.: Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 3727-3732
- [63] Rodríguez M., Pujol M., Pérez L., Gavilondo J.V., Garrido G., Ayala M., Pérez M., Bequet-Romero M., Cabrera G., Ramos O., Hernández I., González E.M., Huerta V., Sánchez B., Mateo C. i wsp.: Transgenic plants of *Nicotiana tabacum* L. express aglycosylated monoclonal antibody with antitumor activity. *Biotechnol. Appl.*, 2013; 30: 157-161
- [64] Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R.E., López-Revilla R., Moreno-Fierros L., Alpuche-Solís A.G.: Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep.*, 2008; 27: 79-84
- [65] Rosenberg Y., Sack M., Montefiori D., Forthal D., Mao L., Hernandez-Abanto S., Urban L., Landucci G., Fischer R., Jiang X.: Rapid high-level production of functional HIV broadly neutralizing mo-

- noclonal antibodies in transient plant expression systems. *PLoS One*, 2013; 8: e58724
- [66] Ruhlman T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H.: Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol. J.*, 2007; 5: 495-510
- [67] Rybicki E.P.: Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol. J.*, 2010; 8: 620-637
- [68] Sack M., Paetz A., Kunert R., Bomble M., Hesse F., Stiegler G., Fischer R., Katinger H., Stoeger E., Rademacher T.: Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *FASEB J.*, 2007; 21: 1655-1664
- [69] Sakhno L.O., Krasko O.Y., Olevinska Z.M., Spivak M.Y., Kuchuk M.V.: Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human alpha 2b interferon gene. *Tsitol. Genet.*, 2012; 46: 12-18
- [70] Sharp J.M., Doran P.M.: Effect of bacitracin on growth and monoclonal antibody production by tobacco hairy roots and cell suspensions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 1999; 4: 253-258
- [71] Shchelkunov S.N., Salyaev R.K., Pozdnyakov S.G., Rekoslavskaya N.I., Nesterov A.E., Ryzhova T.S., Sumtsova V.M., Pakova N.V., Mishutina U.O., Kopytina T.V., Hammond R.W.: Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnol. Lett.*, 2006; 28: 959-967
- [72] Shin Y.J., Hong S.Y., Kwon T.H., Jang Y.S., Yang M.S.: High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003; 82: 778-783
- [73] Sirko A., Vaněk T., Góra-Sochacka A., Radkiewicz P.: Recombinant cytokines from plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011; 12: 3536-3552
- [74] Swiech K., Picanço-Castro V., Covas D.T.: Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr. Purif.*, 2012; 84: 147-153
- [75] Tackaberry E.S., Dudani A.K., Prior F., Tocchi M., Sardana R., Altosaar I., Ganz P.R.: Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine*, 1999; 17: 3020-3029
- [76] Tayal V., Kalra B.S.: Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008; 579: 1-12
- [77] Thanavala Y., Mahoney M., Pal S., Scott A., Richter L., Natarajan N., Goodwin P., Arntzen C.J., Mason H.S.: Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 3378-3382
- [78] Tokuhara D., Álvarez B., Mejima M., Hiroiwa T., Takahashi Y., Kurokawa S., Kuroda M., Oyama M., Kozuka-Hata H., Nochi T., Sagara H., Aladin F., Marcotte H., Frenken L.G., Iturriza-Gómara M. i wsp.: Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J. Clin. Invest.*, 2013; 123: 3829-3838
- [79] Tremblay R., Wang D., Jevnikar A.M., Ma S.: Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol. Adv.*, 2010; 28: 214-221
- [80] Triguero A., Cabrera G., Cremata J.A., Yuen C.T., Wheeler J., Ramirez N.I.: Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotechnol. J.*, 2005; 3: 449-457
- [81] Vézina L.P., Faye L., Lerouge P., D'Aoust M.A., Marquet-Blouin E., Burel C., Lavoie P.O., Bardor M., Gomord V.: Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol. J.*, 2009; 7: 442-455
- [82] Virágh M., Vörös D., Kele Z., Kovács L., Fizil A., Lakatos G., Maróti G., Batta G., Vágvölgyi C., Galgóczy L.: Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections. *Protein Expr. Purif.*, 2014; 94: 79-84
- [83] Wang X., Brandsma M., Tremblay R., Maxwell D., Jevnikar A.M., Huner N., Ma S.: A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnol.*, 2008; 8: 87
- [84] Wang Y., Deng H., Zhang X., Xiao H., Jiang Y., Song Y., Fang L., Xiao S., Zhen Y., Chen H.: Generation and immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed in transgenic rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 380: 292-297
- [85] Wirz H., Sauer-Budge A.F., Briggs J., Sharpe A., Shu S., Sharon A.: Automated production of plant-based vaccines and pharmaceuticals. *J. Lab. Autom.*, 2012; 17: 449-457
- [86] Xu K., Evans D.B., Carrin G., Aguilar-Rivera A.M., Musgrove P., Evans T.: Protecting households from catastrophic health spending. *Health Aff.*, 2007; 26: 972-983
- [87] Yusibov V., Streatfield S.J., Kushnir N.: Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Hum. Vaccin.*, 2011; 7: 313-321
- [88] Zhang C., Allegretti M., Vonck J., Langer J.D., Marcia M., Peng G., Michel H.: Production of fully assembled and active *Aquifex aeolicus* F₁F₀ ATP synthase in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1840: 34-40
- [89] Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D., Gonzalez-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A.M., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C., Bock R.: High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol. J.*, 2008; 6: 897-913
- [90] Zhou Y.X., Lee M.Y., Ng J.M., Chye M.L., Yip W.K., Zee S.Y., Lam E.: A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice. *World J. Gastroenterol.*, 2006; 12: 306-312
- [91] Zhu Z., Hughes K.W., Huang L., Sun B., Liu C., Li Y., Hou Y., Li X.: Expression of human α -interferon cDNA in transgenic rice plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 1994; 36: 197-204

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.