

ANNA DOBROWOLSKA
IV Liceum Ogólnokształcące
Pomorska 16, 91–416 Łódź
e-mail: annadobrow@interia.pl

WYKORZYSTANIE ROŚLIN DO WYTWARZANIA BIOFARMACEUTYKÓW

WPROWADZENIE

Wykorzystanie roślin w medycynie było powszechne od początku rozwoju cywilizacji. Zidentyfikowano czynniki farmakologicznie aktywne wielu roślin, a obecnie około jedna czwarta dostępnych leków jest pochodzenia roślinnego. Nowoczesna biotechnologia stwarza możliwości szerszego wykorzystania własności leczniczych roślin (GIDDINGS 2001).

Od wielu lat mikroorganizmy wykorzystywane są jako system ekspresji białek (CARTRAIN i współaut. 2000). Wybór ten uwarunkowany jest stosunkowo niską ceną oraz wygodnym systemem produkcyjnym. Jednakże bakterie nie posiadają zdolności do więk-

szości post-translacyjnych modyfikacji niezbędnych dla aktywności wielu białek ssaków. Natomiast uzyskiwanie białek z komórek ssaków jest procesem kosztownym. Ograniczenia te zdecydowały o zwróceniu uwagi i prowadzeniu badań nad roślinnymi systemami ekspresyjnymi, jako stosunkowo tanią, bezpieczną oraz efektywną alternatywą.

O wyborze roślin jako systemów ekspresyjnych zadecydował rozwój technologii rekombinowanego DNA, metod molekularnych w medycynie i technologii transgenetyki roślin, tzn. otrzymywania roślin genetycznie modyfikowanych.

OTRZYMYWANIE W ROŚLINACH TRANSGENICZNYCH REKOMBINOWANYCH BIOFARMACEUTYKÓW

W anglojęzycznej literaturze naukowej często spotykane jest określenie „molecular farming” określające produkcję, przy wykorzystaniu roślin, białek o właściwościach farmakologicznych, a także tych użytecznych w przemyśle, rolnictwie czy weterynarii. Termin ten odnosi się do produkcji polowej rekombinowanych białek przez rośliny, nie dotyczy zaś kultur *in vitro*, takich jak zawiesiny komórkowe, kalus czy korzenie. Niewątpliwie technologia *in vitro* stała się impulsem dla powstania idei wykorzystania roślin do wytwarzania białek o właściwościach farmakologicznych, a w chwili obecnej kultury *in vitro* stanowią laboratoryjne poletko doświadczalne.

Zaletą otrzymywania w roślinach genetycznie modyfikowanych biofarmaceutyków jest ekonomiczna atrakcyjność produkowanych białek (DORAN 2000). Dzięki temu możliwe jest wytwarzanie na skalę produkcyjną aktywnego oraz bezpiecznego farmakologicznie białka w atrakcyjnej dla klienta cenie. Wyróżnia się dwa etapy otrzymywania rekombinowanych biofarmaceutyków w roślinach transgenicznych: (1) optymalizacja systemu ekspresji, (2) produkcja białka na szeroką skalę w celach komercyjnych.

Produkcję rekombinowanych białek o właściwościach terapeutycznych lub diagnostycznych przy wykorzystaniu roślin upraw-

nych poprzedza faza przygotowania, polegająca na identyfikacji białka posiadającego pożądaną aktywność terapeutyczną lub diagnostyczną, jego molekularnej charakterystyce i ostatecznie ekspresji w heterologicznym systemie.

Po raz pierwszy ekspresję rekombinowanego farmaceutyku uzyskano w 1986 r. Było nim białko fuzyjne ludzkiego hormonu wzrostu wytwarzane w komórkach kalusa transformowanego tytoniu oraz słonecznika.

Obecnie zapotrzebowanie na rekombinowane białka jest ogromne. Wciąż odkrywane są nowe własności farmakologiczne białek.

FARMACEUTYKI UZYSKANE W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Dzięki sekwencjonowaniu genomu ludzkiego oraz prowadzonym na szeroką skalę badaniom medycznym wzrasta wiedza dotycząca medycznego oraz biologicznego podłoża wielu chorób oraz identyfikuje się wiele białek o właściwościach terapeutycznych. Liczba białek uzyskanych w komórkach roślinnych wciąż rośnie. Listę wybranych biofarmaceutyków uzyskiwanych w komórkach roślinnych przedstawiono w Tabeli 1. Światowe zapotrzebowanie na biofarmaceutyki jest ogromne, np. roczne zapotrzebowanie na ludzką albuminę osocza (HSA) (FISCHER i współaut. 1999a, b), która jest nieglikolizowanym białkiem, sięga

Rośliny transgeniczne produkujące duże ilości bezpiecznych oraz funkcjonalnych białek rekombinowanych, mogą być wykorzystane do wytwarzania tych białek na dużą skalę. Obecnie metody biotechnologii roślinnej oraz system ekspresji rekombinowanych białek wykorzystywany jest do produkcji składników krwi (MAGNUSON i współaut. 1998) czy szczeniok (ARNTZEN 1997, KAPUSTA i współaut. 1999). Ostatnio, wszechstronny przegląd piśmiennictwa naukowego dotyczącego tych zagadnień przedstawił DANIEL i współaut. (2001).

550 ton (dane dotyczą oczyszczonego białka). Koszt białka pozyskiwanego z krwi ludzkiej jest bardzo wysoki. Ponadto, wyizolowana tą metodą albumina osocza może nieść ryzyko zakażenia wirusowego. A zatem istnieje potrzeba zastosowania alternatywnego systemu produkcyjnego eliminującego wymienione niedogodności oraz zagrożenia. Można do tego celu wykorzystać rośliny. Albumina osocza może być bezpiecznie wytwarzana w komórkach roślinnych, podobnie jak interleukiny, interferony oraz enzymy ludzkie. Obecnie oczyszczanie białek z materiału roślinnego jest procesem trudnym i pracochłonnym.

PRODUKCJA PRZECIWCIAŁ O WŁASNOŚCIACH TERAPEUTYCZNYCH W ROŚLINACH

Przeciwciała stanowią przykład białek o właściwościach farmakologicznych, których ekspresję uzyskano w roślinach. Po raz pierwszy uzyskano ekspresję funkcjonalnych przeciwciał w liściach tytoniu (HIATT i współaut. 1989). Wagę tego wydarzenia podkreśla fakt, że rekombinowane przeciwciała (rAbs) stanowią niezbędne terapeutyczne oraz diagnostyczne narzędzie wykorzystywane w medycynie, naukach biologicznych oraz biotechnologii. Techniki rekombinacji DNA oraz wytwarzania rekombinowanych przeciwciał pozwoliły na produkcję nowych polipeptydów o pożądanym cechach oraz izolację rAbs rozpoznających niemal każdy antygen. Przeciwciała z całą pewnością będą odgrywały w przyszłości ważną rolę w terapii i diagnostyce medycznej (ZIEGLER i współaut. 2000).

Nie ustalono dotychczas, które gatunki roślin, bądź które tkanki roślinne byłyby najbar-

dziej przydatne dla produkcji tych związków na skalę przemysłową. Większość uzyskanych do tej pory przeciwciał uzyskano w tytoniu – roślinie modelowej, chociaż ostatnio sukcesem zakończyły się także próby przeprowadzone z wykorzystaniem ryżu oraz pszenicy (STOGER 2000). Największą korzyścią płynącą z wykorzystania tkanki roślinnej jest łatwość jej produkcji. Dla przykładu, potencjalna biomasa rocznych plonów lucerny i tytoniu to odpowiednio 20 ton/ha oraz ponad 100 ton/ha. W przypadku ziaren pszenicy, ryżu, czy kukurydzy to odpowiednio około 3 tony/ha, 6 ton/ha oraz 12 ton/ha. Kolejnymi zaletami wykorzystania roślin jest łatwość ich genetycznej modyfikacji oraz produkcja dużej ilości nasion (czasami około 1 mln w przypadku jednej rośliny).

Jednym z przykładów przeciwciał uzyskiwanych na tej drodze jest testowane obecnie na człowieku chimeryczne przeciwciało prze-

ciwko powierzchniowemu antygenowi *Streptococcus mutans* – sIgA (CaroRx™), bakterii, która jest głównym sprawcą próchnicy zębów. Przeciwciała uzyskane w tytoniu zaaplikowano nazębnie. Ich efektywność była porównywalna do przeciwciał uzyskiwanych w hodowlach

miast, że przeciwciała te chroniły zęby przed kolonizacją *S. mutans* (MA i współaut. 1998). Druga i trzecia faza prób klinicznych nad preparatem CaroRx™ prowadzona jest obecnie na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Francisco (School of Dentistry). Badania te finanso-

Tabela 1. Produkcja biofarmaceutyków w roślinach transgenicznych i ich potencjalne wykorzystanie w terapii chorób u człowieka.

Potencjalne zastosowanie	Roślina transgeniczna	Białko	Poziom ekspresji*	Literatura
Zapalenie wątroby typu B i C	Ryż	Interferon α	nd**	DANIELL i współaut. 2001
Hormon wzrostu	Tytoń	Somatotropina	7	STAUB 2000
Inhibitor trypsyny, zabiegi transplantacji	Kukurydza	Aprotynina	nd	GIDDINGS 2000
Krwotok	Ryż	α 1-antytrypsyna	nd	TERASHIMA i współaut. 1999
Regulacja układu immunologicznego	Tytoń	Interleukina-2 oraz interleukina-4	nd	MAGNUSON i współaut. 1998
Składniki krwi	Tytoń	Hemoglobina	0,05	DIERYCK i współaut. 1997
Antykoagulant	Tytoń	Białko C	<0,01	CRAMER i współaut. 1996
Anemia	Tytoń	Erytropoetyna	0,01	MATSUMOTO i współaut. 1995
Inhibitor trombiny	Tytoń	Hirudyna	nd	PLERMENTER i współaut. 1995
Oparzenia, zabiegi chirurgiczne	Tytoń	Albumina osocza	0,02	SIJMONS i współaut. 1990

*poziom białka określony został jako % całkowitej puli białek rozpuszczalnych, **niedostępne dane

komórkowych używanych w celu zabezpieczenia przed kolonizacją *S. mutans*. Wstępne badania kliniczne nie wykazały lokalnej ani systemowej toksyczności s-IgA. Stwierdzono nato-

wane są przez amerykańską firmę Planet Biotechnology (Mountain View, CA, USA) (LARRICK i współaut. 1998).

SZCZEPIONKI UZYSKANE W ROŚLINACH

Szczepienia ochronne to niewątpliwie jedno z największych osiągnięć w naukach medycznych XX wieku. Z pewnością przyczyniły się one do wydłużenia życia oraz poprawy zdrowia i życia człowieka. Z drugiej jednak

strony w skali globalnej, szczepienia są jedną z najkosztowniejszych form ochrony zdrowia (wg WHO) i z tego m.in. względu ich zasięg jest ograniczony, głównie w krajach rozwijających się.

Naukowcy w wielu laboratoriach na świecie pracują nad szczepionkami doustnymi i doustną formą leków.

Zmodyfikowane genetycznie rośliny mogą wytwarzać wiele immunogennych antygenów. Wysłano propozycję indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej (tj. odpowiedzi, w której biorą udział limfocyty B oraz T) wykorzystując rośliny jako źródło „jadalnych szczepionek” (nie należy literalnie odczytywać szczepienia jako „jedzenia szczepionek”), gdzie antygeny stanowiące podstawę szczepionek byłyby spożywane w owocach lub surowych warzywach (WALMSLEY i ARTZEN 2000). Szczepionki tego typu nie wymagałyby przechowywania w niskich temperaturach oraz wyrafinowanych ekspertyz w celu ich dystrybucji oraz wykorzystania w krajach rozwijających się. Aktywności jadalnych szczepionek zostały udowodnione dla transgenicznych ziemniaków wytwarzających podjednostkę termolabilnej enterotoksyny B enterotoksycznej *E. coli* (MA i współaut. 1998). U myszy karmionych surowym transgenicznym ziemniakiem zaobserwowano indukcję odpowiedzi immunologicznej na antygen. Inne prace wykazały, iż jadalne szczepionki mogą funkcjonować chroniąc przed wirusem wścieklizny, wirusem zapalenia wątroby typu B czy toksyną cholery. W Polsce uzyskano także efektywną ja-

dalną szczepionkę przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B. Wykazano ekspresję powierzchniowego antygeny HBsAg w transgenicznym łubinie oraz sałacie. Myszy, a następnie ludzie karmieni transgenicznymi roślinami wytwarzali specyficzne przeciwciała przeciwko żółtacze (KAPUSTA i współaut. 1999). Przetworzono wiele roślin w celu uzyskania jadalnych szczepionek; pomidory oraz banany (otrzymanie linii roślin transgenicznych trwa w przypadku tej rośliny drzewiastej kilka do kilkunastu lat!) wydają się być jednak najbardziej atrakcyjnymi producentami jadalnych szczepionek dla ludzi, podczas gdy zboża wydają się odpowiedniejsze dla immunizacji zwierząt.

Aby jadalne szczepionki mogły mieć szersze zastosowanie należy rozpatrzyć szereg zagadnień. Jadalne szczepionki będą potrzebowały odpowiedniej organizacji ich dystrybucji [w Polsce wykorzystanie organizmów genetycznie zmodyfikowanych reguluje Ustawa z dnia 22 czerwca 2001r. (Dz.U. z 2001 r. Nr 76, poz. 811) i udostępniania ludziom, aby zapewnić ich efektywność porównywalną z obecnie stosowanymi szczepionkami. Co więcej, niezbędna będzie wewnętrzna kontrola poziomu ekspresji antygeny, jego stabilności oraz efektywności w każdej roślinie.

ZALETY I WADY OTRZYMYWANIA W ROŚLINACH GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH REKOMBINOWANYCH BIOFARMACEUTYKÓW

Systemy ekspresji roślin wydają się być atrakcyjniejsze w porównaniu z systemami ekspresji klasycznej opartej na komórkach bakterii, drożdży oraz zwierząt.

Po pierwsze, posiadają one eukariotyczne szlaki syntezy białek. Komórki bakteryjne nie posiadają zdolności produkcji kompletnych białek ssaków oraz modyfikacji post-translacyjnych występujących w komórkach *Eukaryota*. Po drugie, w przypadku produkcji roślinnej nie ma możliwości zanieczyszczenia białek ludzkimi czy zwierzęcymi patogenami (wirus HIV, wirus żółtaczki) czy patogenami krwi, co może mieć miejsce w przypadku zwierzęcych systemów ekspresyjnych.

Bakteryjne systemy ekspresji białek zwykle wymagają kosztownego oraz złożonego procesu oczyszczania. Bakterie bowiem wytwarzają trudne do usunięcia endotoksyny. Białka rekombinowane uzyskiwane w komórkach bak-

teryjnych często występują w postaci tzw. ciał inkluzyjnych, co wymaga dodatkowych kosztów oraz pracy w celu uzyskania natywnej, tzn. aktywnej formy białka. Hodowla komórek ssaków może być trudna, wymaga specjalistycznego sprzętu oraz drogich podłoży hodowlanych takich jak np. podłoża zawierające osocze. Wykorzystując klasyczne metody ekspresji, należy wziąć pod uwagę konieczność post-translacyjnej obróbki rekombinowanych białek oraz usunięcie sekwencji markerowych (np. HIS-tag lub FLAG), zanieczyszczeń białkowych oraz wirusowych przed ich aplikacją terapeutyczną *in vivo*.

Inne potencjalne korzyści wytwarzania w roślinach rekombinowanych białek o charakterze biofarmaceutyków istotnych w aplikacjach klinicznych przedstawiono poniżej.

1. Systemy roślinne są bardziej ekonomiczne niż technologie przemysłowe wykorzy-

stujące fermentory lub inne systemy bioreakcyjne.

2. Obecnie stosowane technologie rolnicze bez dodatkowych modyfikacji mogłyby z powodzeniem zostać wykorzystywane do hodowli roślin transgenicznych na dużą skalę.

3. Etap oczyszczania białek może zostać pominięty jeżeli rekombinowane białka będą podawane doustnie.

4. W przypadku roślin istnieje możliwość skierowania białka do odpowiednich wewnątrzkomórkowych przedziałów, gdzie wykazują one większą stabilność (np. chloroplasty).

5. Ilości rekombinowanych białek osiąga w roślinach poziom produkcyjny – nawet do 14% całej puli białek rozpuszczalnych.

Z pewnością w przyszłości lista ta wydłuży się. Jeżeli chodzi o produkcję wspomnianych

białek, rośliny wydają się stanowić dobry system jako alternatywa transgenicznych zwierząt. Jednakże, wymienionym korzyściom towarzyszą ujemne strony. Jedną z nich jest czas wymagany do uzyskania linii roślin transgenicznych wykazujących stałą ekspresję pożądanego genu (okres kilku-, a nawet kilkunastoletni), potencjalne problemy związane z wyciszeniem transgenów (WASSENEGGER i PELISSIER 1998) oraz wciąż zbyt mała wiedza dotycząca procesu oczyszczania rekombinowanych białek pochodzących z roślin. W przypadku białek mających zastosowanie diagnostyczne lub terapeutyczne stopień oczyszczenia posiada niezmiernie istotne znaczenie. Białka nie mogą wywoływać zakażenia i stanów zapalnych, zwłaszcza, gdy wprowadzane są dożylnie.

THE PRODUCTION OF BIOPHARMACEUTICALS IN PLANTS

S u m m a r y

The use of plants for medicinal purposes dates back thousands years but genetic engineering of plants to produce desired biopharmaceuticals is much more recent. "Molecular farming" is the production of recombinant proteins in plants. It is intended to increase the power of agriculture to cultivate and harvest transgenic plants producing recombinant therapeutics. Molecular farming has the potential to provide diagnostic and therapeutic tools in both health care and the life science.

In the past decade, plants have been actively considered as an important expression system and a number of recombinant proteins such as hepatitis B (HbsAg) or cholera toxin B were produced in this system. Plant expression system may be useful for pro-

ducing pharmaceuticals, as large amount of protein can be produced at a relatively low cost. In addition, plants are capable of complex post-translational modification as that in *Eukaryota*. Preliminary clinical trials using transgenic lettuce plants expressing hepatitis B virus surface antigen showed encouraging immune response in human volunteers, thus suggesting that human may be immunised orally against HBV with plants expressing the viral antigen.

Plant – derived biopharmaceuticals are cheap to produce and store, easy to scale up for mass production and safer than those derived from animals. Positive sides as well as possible negative concerns connected with molecular farming are discussed in the article.

LITERATURA

- ARNTZEN C. J., 1997. *High-tech herbal medicine: plant-based vaccines*. Nature Biotechnol. 15, 221–223.
- CARTRAIN M., SALMON P. M., ROBINSON D. K., BUCKLAND B. C., 2000. *Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals*. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 209–214.
- CRAMER C. L., WEISSENBORN D. L., OISHI K. K., GRABAU E. A., BENNETT S. P., GRABOWSKI G. A., RADIN D. N., 1996. *Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco*. Ann. NY Acad. Sci. 25, 62–71.
- DANIEL H., STREATFIELD S. J., WYCOFF K., 2001. *Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants*. Trends Plant Sci. 6, 219–226.
- DIERYCK W., PAGNIER J., POYART C., MARDEN M. C., GRUBER V., BOURNAT I., BAUDINO S., MEROT B., 1997. *Human haemoglobin from transgenic tobacco*. Nature 386, 29–30.
- DORAN P. M., 2000. *Foreign protein production in plant tissue cultures*. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 199–204.
- FISCHER R., DROSSARD J., COMMANDEUR U., SCHILLBERG S., EMANS N., 1999a. *Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants*. Biotechnol. Appl. Biochem. 30, 101–108.
- FISCHER R. L., LIAO Y. C., HOFFMANN K., SCHILLBERG S., EMANS N., 1999b. *Molecular farming of recombinant antibodies in plants*. Biol. Chem. 380, 825–839.

- GIDDINGS G., 2000. *Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals*. Nat. Biotechnol. 18, 1151-1155.
- GIDDINGS G., 2001. *Transgenic plants as protein factories*. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 450-454.
- HIATT A., CAFFERKEY R., BOWDISH K., 1989. *Production of antibodies produced in plants*. Nature 342, 76-78.
- JORGENSEN R., SNYDER C., JONES J. D. G., 1987. *T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with Agrobacterium tumefaciens C58 derivatives*. Mol. Gen. Genet. 207, 471-477.
- KAPUSTA J., MODELSKA A., FIGLEROWICZ M., PNIEWSKI T., LETELLIER M., LISOWA O., YUSIBOV V., KOPROWSKI H., PLUCIENNICZAK A., LEGOCKI A. B., 1999. *A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus*. FASEB J. 13, 1796-1799.
- LARRICK J. W., YU L., CHEN J., JAISWAL S., WYCOFF K., 1998. *Production of antibodies in transgenic plants. In vivo and in vitro production of mAbs*. 7th Forum in Immunology.
- MA J. K., HIKMAT B. Y., WYCOFF K., VINE N. D., WANG F., STABILA P., VAN DOLLEWEERD C., MOSTOW K., LEHNER T., 1998. *Generation and assembly of secretory antibodies in plants*. Science 268, 716-719.
- MAGNUSON N. S., LINZMAIER P. M., REEVES R., AN G., HAYGLASS K., LEE J. M., 1998. *Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture*. Protein Expr. Purif. 13, 45-52.
- MATSUMOTO S., IKURA K., UEDA M., SASAKI R., 1995. *Characterization of human glycoprotein (erythroprotein) produced in cultured tobacco cells*. Plant. Mol. Biol. 27, 1163-1172.
- PERMENTER D. L., BOOTHE J.G., VAN ROOIJEN G. J., YEUNG E. C., MOLONEY M. M., 1995. *Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning*. Plant Mol. Biol. 29, 1167-1180.
- SIJMONS P. C., DEKKER B. M., SCHRAMMEIJER B., VERWOERD T. C., VAN DEN P. J., HOEKEMA A., 1990. *Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants*. Biotechnology 8, 217-221.
- STAUB J. M., 2000. *High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplast*. Nature Biotechnol. 18, 333-338.
- STOGER E., 2000. *Cereal crops as viable production and storage system for pharmaceutical scFv antibodies*. Plant Mol. Biol. 42, 583-590.
- TERASHIMA M., MURAI Y., KAWAMURA M., NAKANISHI S., STOLTZ T., CHEN L., DROHAN W., RODRIGUEZ R. L., KATOH S., 1999. *Production of functional human alpha 1-antitrypsin by plant cell culture*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 516-523.
- WALMSLEY A., ARNTZEN C., 2000. *Plants for delivery of edible vaccines*. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 126-129.
- WASSENEGGER M., PELISSIER T., 1998. *A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants*. Plant Mol. Biol. 37, 349-362.
- ZIEGLER M., THOMAS S., DANNA K., 2000. *Accumulation of a thermostable endo-1,4-b-D-glucose in the apoplast of Arabidopsis thaliana leaves*. Mol. Breed. 6, 37-46.