

Jaromir BUDZIANOWSKI

## Nowa rola tytoniu – produkcja biofarmaceutyków

New role for tobacco – production of biopharmaceuticals

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań  
Kierownik: Prof. dr hab. Jaromir Budzianowski

### Dodatkowe słowa kluczowe:

tytoń  
biofarmaceutyki  
biotechnologia

### Additional key words:

tobacco  
biopharmaceuticals  
biotechnology

Ponad sto biofarmaceutyków znajdujących się obecnie na rynku farmaceutycznym - wśród nich głównie terapeutycznych peptydów i białek typu hormony, enzymy, interferony, czynniki krwi, przeciwciała monoklonalne, szczepionki, substancje wzrostowe i białka fuzyjne, otrzymywanych jest za pomocą technologii rekombinowanego DNA w hodowlach transgenicznych komórek bakteryjnych (*Escherichia coli*), drożdżowych (*Saccharomyces cerevisiae*) i ssaczych (CHO, BHK) i sporadycznie owadziech (*Bombyx mori*). Wysokie koszty ich otrzymywania przy wzrastającym zapotrzebowaniu na istniejące i nowe biofarmaceutyki skłaniają do poszukiwania tańszych metod ich wytwarzania z użyciem transgenicznych zwierząt gospodarczych, a w szczególności transgenicznych roślin uprawnych. Wśród wielu gatunków roślin testowanych na przydatność do produkcji biofarmaceutyków, jak zboża, rośliny strączkowe, oleiste, warzywne i owocowe, wodne i mchy, szczególnymi zaletami wyróżniają się dwa gatunki tytoniu - *Nicotiana tabacum* i *N. benthamiana*. Obce białka mogą być w nich wytwarzane nie tylko za pośrednictwem genomu jądrowego, ale także łatwo w genomie chloroplastowym, przez transformację przejściową oraz przez namnażanie transgenicznego wirusa roślinnego - np. wirusa mozaiki tytoniowej (TMV). Wykazano przydatność tytoniu do wytwarzania różnych białek terapeutycznych, nawet tak złożonych jak przeciwciała, w tym wydzielniczej immunoglobuliny A (sIgA), z częściową humanizacją N-glikanów. Szczególnie cenna jest możliwość szybkiego otrzymywania, nawet w przeciągu tygodnia, szczepionek i przeciwciał monoklonalnych do badań klinicznych lub indywidualnej terapii przeciwnowotworowej, w wyniku transformacji przejściowej lub infekcji transgenicznym wirusem. Tytoń z obcym genem może być zastosowany do celów produkcyjnych na dwa sposoby - albo w formie uprawy polowej lub szklarniowej, albo w formie kultury komórkowej zawiesinowej *in vitro*. Wśród wielu wytworzonych w tytoniu biofarmaceutyków, kilka szczepionek i przeciwciał jest w zaawansowanych stadiach rozwoju, w badaniach klinicznych, prawdopodobnie bliskich wprowadzenia do lecznictwa.

Over one hundred of biopharmaceuticals present on the pharmaceutical market - among them mainly therapeutically peptides and proteins such as hormones, enzymes, interferons, blood factors, monoclonal antibodies, vaccines, growth factors and fusion proteins, are manufactured through recombinant DNA technology in cultures of transgenic bacterial (*Escherichia coli*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and mammalian cells (CHO, BHK) and rarely insect cells or insects (*Bombyx mori*). High costs of their manufacturing with simultaneous increased demand for existing and new biopharmaceuticals prompt for the search of cheaper methods of production by using transgenic domestic animals and, in particular, in transgenic crop plants. Among many plant species investigated for ability to produce biopharmaceuticals, such like cereals, legumes, oil plants, vegetables and fruit plants, aquatic plants and mosses, the outstanding features posses two tobacco species - *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana benthamiana*. Foreign proteins can be expressed in those plants not only in nuclear genome, but also easily in chloroplast genome, through transient transformation and propagation of transgenic plant virus - e.g. tobacco mosaic virus (TMV). Tobacco was shown to be useful to produce various therapeutical proteins, even such complex ones as antibodies including secretory immunoglobulin A (sIgA), with partial humanization of N-glycans. Especially important is possibility of rapid preparation, even within a week, vaccines and monoclonal antibodies for clinical tests or personalized anti-cancer therapy through transient transformation or infection with transgenic virus. Tobacco with foreign gene may be employed for manufacture in two ways - either in field or green-house cultivation or in the form of *in vitro* suspension cell culture. Among many biopharmaceuticals expressed in tobacco, several vaccines and antibodies are in advanced stages of development, in clinical evaluations and probably close to application in medicine.

Adres do korespondencji:  
Prof. dr hab. Jaromir Budzianowski  
Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin  
Uniwersytet Medyczny  
im. Karola Marcinkowskiego  
61-861 Poznań, ul. Św. Marii Magdaleny 14  
Tel. (+61) 66 87 848; fax: (+61) 66 87861  
e-mail: jbudzian@ump.edu.pl

## Wstęp

Dzięki rozwojowi biologii molekularnej do lecznictwa wprowadzono wiele cennych leków o charakterze peptydów i białek zwanych biofarmaceutykami, jak czynniki krwi, hormony, enzymy, interferony, czynniki wzrostowe, przeciwciała monoklonalne, szczepionki, o naturalnej lub celowo zmienionej sekwencji aminokwasów, otrzymywane za pomocą technologii rekombinowanego DNA. Obecnie, produkcja biofarmaceutyków na skalę komercyjną lub badań przeprowadzana jest głównie za pomocą hodowli in vitro transgenicznych komórek bakteryjnych (*Escherichia coli*), drożdżowych (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz ssaczy (CHO, BHK) i w ograniczonym zakresie w transgenicznych owadach i ich komórkach (*Bombyx mori*) [2,23,27,28]. Wysokie koszty handlowe biofarmaceutyków, na które składają się koszty prowadzenia hodowli w bioreaktorach oraz koszty oczyszczania produktu końcowego, jak również wzrastające zapotrzebowanie na istniejące i nowe biofarmaceutyki, wywierają presję na poszukiwanie tańszych i bardziej wydajnych metod. Prace te zmiernają z jednej strony do poprawienia istniejących metod produkcji, z drugiej strony, do wykorzystania nowych systemów ekspresji białek obcych (heterologicznych) – transgenicznych zwierząt gospodarczych i transgenicznych roślin uprawnych. Dotychczasowe doświadczenia i kalkulacje ekonomiczne wskazują, że nieograniczoną wydajność i radykalne zmniejszenie kosztów produkcji nastąpiłyby w przypadku otrzymywania biofarmaceutyków w transgenicznych roślinach uprawnych [6,11,12,28,37]. Do roli producenta biofarmaceutyków kandyduje wiele gatunków roślin uprawnych – zboża (kukurydza, ryż, jęczmień), rośliny strączkowe (soja, groch), rośliny oleiste (rzepak, krokosz), rośliny warzywne (ziemniak, sałata, marchew, szpinak), rośliny owocowe (pomidor, banan), tytoń (gatunki *Nicotiana tabacum*, *N. bethamiana*), a także specyficzne gatunki w hodowli w bioreaktorach (rzęsa wodna - *Lem-*

Tabela I

Porównanie poziomu ekspresji wybranych biofarmaceutyków w transgenicznym tytoniu w genomie jądrowym i chloroplastowym.

Expression level of selected biopharmaceuticals in transgenic tobacco in nuclear and chloroplast genomes.

Peptyd	Poziom ekspresji (% TSP) *	
	w genomie jądrowym	w genomie chloroplastowym
Somatotropina (hST)	< 0,01 %	8%
ludzka albumina osocza (HSA)	0,02 %	11,1%
szczepionka antygenowa przeciwko cholercie – podjednostka B toksyny cholery (CTB)	0,01 %	25%

\* % TSP - procent całkowitego białka rozpuszczalnego

na, mech - *Physcomitrella reptans*) [7,10,20,26,27]. Tytoń wyróżnia się kilkoma korzystnymi cechami. Jako roślina uprawna może być zbierany kilkakrotnie w ciągu roku i dostarcza największej biomasy – około 100 ton z hektara. Obce białka mogą być wytwarzane w nim w wyniku transformacji genetycznej na kilka sposobów – w genomie jądrowym, genomie chloroplastowym (plastydowym), przez transformację przejściową genomu jądrowego oraz przez zakażenie i namnażanie wirusa roślinnego - wirusa mozaiki tytoniowej (TMV) [23,36,39]. Dotąd w tytoniu uzyskano ekspresję wielu białek terapeutycznych, jak hormony, interferony, szczepionki, przeciwciała monoklonalne i inne białka użyteczne w medycynie, a kilka osiągnęło zaawansowany stopień rozwoju i znajduje się w badaniach klinicznych.

### Metody stosowane w otrzymywaniu biofarmaceutyków w tytoniu

W celu wytworzenia obcego białka w tytoniu należy wprowadzić do niego gen (cDNA) kodujący to białko, a następnie wyodrębnić je z tkanki roślinnej (z liści) i oczyścić. Można wyróżnić cztery podstawowe sposoby dokonania ekspresji takiego białka w tytoniu [3,4,37].

Pierwszy sposób polega na trwałym wprowadzeniu do genomu jądrowego obcego genu (transgen) za pomocą bakterii glee-

bowej *Agrobacterium tumefaciens*, która posiada naturalny aparat transformacji genetycznej roślin. W tym celu krawki wycięte ze sterylnych liści tytoniu inkubuje się z zawiesiną komórek odpowiednio przygotowanego szczepu *Agrobacterium* zawierającego gen kodujący dany biofarmaceutyk. Po wyselekcjonowaniu na pożywcze z antybiotykiem fragmentów liści, które uległy transformacji albo otrzymuje się z nich kulturę komórkową zawiesinową albo regeneruje się z nich pędy, które po ukorzenieniu przenosi się kolejno do doniczek, szklarni i uprawy polowej. Zaletą tego typu transformacji zwanej agroinfekcją jest trwałość, tzn. transgen jest dziedziczony w następnych pokoleniach rośliny, a wytworzone białko może ulegać w pełni modyfikacjom potranslacyjnym, szczególnie glikozylacji.

Drugi sposób polega na trwałym wprowadzeniu obcego genu do genomu chloroplastowego (plastomu) [3,4,5]. W tym celu tkankę roślinną bombarduje się za pomocą tzw. działa genowego cząstkami metalu z naniesionymi plazmidami zawierającymi gen biofarmaceutyku. Zaletą transformacji genomu plastydowego jest możliwość wprowadzenia do 5000 kopii obcego genu w pojedynczej komórce, gdyż komórka taka zawiera około 50 chloroplastów, a 1 chloroplast może mieć 100 kopii genu. W konsekwencji można się spodziewać ekspresji obcego

Tabela II

Farmaceutyki wytwarzane w tytoniu w zaawansowanych stadiach rozwoju.

Tobacco-made pharmaceuticals in advanced stages of development.

Produkt	Zastosowanie	Środowisko	Status	Firma
<b>SZCZEPIONKI</b>				
białko TGF-Beta (Ligand, receptor kinazy tyrozynowej)	rak jajnika	tytoń z transformowanymi chloroplastami	zaawansowane próby na zwierzętach	Chlorogen & partner (USA)
jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała (scFv)	niezłazniczy chłoniak złośliwy (non Hodgkin's lymphoma)	tytoń zainfekowany wirusem TMV	faza I	Large Scale Biology (USA)
białko HN wirusa Newcastle	choroba Newcastle u drobiu	kultura komórkowa	dopuszczony przez USDA w 2006 r.	Dow Agro Sciences (USA)
Antygen	szczepionka przeciw parwowirusowi kotów	uprawa polowa	zaawansowany	Large Scale Biology (USA)
Antygen	szczepionka przeciw Papilloma virus	uprawa polowa	wczesne badania	Large Scale Biology (USA)
<b>PRZECIWCIAŁA</b>				
slgA "CaroRx" (wydzielnicza IgA)	zapobieganie próchnicy zębów	uprawa polowa	faza II dopuszczony w EU w 2003 r.	Planet Biotechnology (USA)
DoxoRX	skutki uboczne chemioterapii raka	uprawa szklarniowa	faza I zakończona	Planet Biotechnology (USA)
RhinoRx	Przeziębienie - rhinowirusy	uprawa polowa	faza I/II	Planet Biotechnology (USA)

białka na poziomie wielokrotnie wyższym niż w genomie jądrowym, do 47% całkowitego białka rozpuszczalnego (% TSP) (tabela I).

Względną wadą jest brak możliwości glikozylacji, ponieważ ta nie zachodzi w chloroplastach. Transgeny są przekazywane do następnych pokoleń tylko w linii żeńskiej, nie mogą być przenoszone za pomocą pyłku kwiatowego (w linii męskiej). Trzeci sposób polega na przejściowej transformacji genomu jądrowego, tzn. nietrwałej, nie dziedzicznej, W tym celu zawieszanie bakterii *Agrobacterium* z transgenem biofarmaceutyku, albo wstrzykuje się za pomocą strzykawki bez igły do spodniej strony liścia albo zanurza się w tej zawieszanie liść i podaje chwilowo próżni. W obu przypadkach, w wyniku tego zabiegu zwanego agroinfiltracją, komórki *Agrobacterium* przenikają przez aparaty szparkowe do przestworów międzykomórkowych miększu gąbczastego liścia. Zaletą tej metody jest uzyskanie ekspresji obcego białka w bardzo krótkim czasie, kilku dni czy tygodnia, a nie miesięcy, jak przy transformacji trwałej (agroinfekcji), a także możliwość równoczesnej ekspresji kilku genów w przypadku zastosowania kilku szczepów transgenicznego *Agrobacterium*. Czwarty sposób polega na zakażeniu tkanki liścia nietransgenicznego tytoniu wirusem mozaiki tytoniowej (TMV, naturalny patogen tytoniu) z wprowadzonym do jego genomu genem danego biofarmaceutyku. Zaletą tej metody jest również uzyskanie szybkiej ekspresji obcego białka, a także równoczesna ekspresja kilku różnych genów w przypadku zastosowania kilku szczepów transgenicznego wirusa TMV.

Poza opisanymi powyżej podstawowymi metodami transformacji genetycznej możliwe są różne ich warianty, Np. zastosowanie *Agrobacterium* zawierającym konstrukty genowe genomu wirusa roślinnego. Ponadto, przy próbach wprowadzenia danego genu stosuje się konstrukty genowe zawierające sekwencje liderowe, tzn. ukierunkowujące ekspresję biofarmaceutyku w określonym kompartmentcie komórki roślinnej, zazwyczaj w cytozolu, reticulum endoplazmatycznym (RE) i apoplacie (sieć połączonych ze sobą przestrzeni na zewnątrz błony plazmatycznej sąsiadujących komórek roślinnych, ale poniżej ściany komórkowej), a czasem w chloroplastach. Wytworzone w wyniku ekspresji obcego genu białko terapeutyczne jest nietrwałe w świeżej masie roślinnej i wymaga niezwłocznego wyodrębnienia, a następnie oczyszczenia od innych składników, zwłaszcza alkaloidów (nikotyna, normikotyna). Do tego celu wykorzystuje się zazwyczaj chromatografię. Wydajność określa się jako procent całkowitego białka rozpuszczalnego (% TSP – z ang. *Total Soluble Protein*). Interesująca jest w przypadku tytoniu możliwość ciągłego zbierania produktu z żywej rosnącej rośliny w postaci wodnego roztworu wydzielanego na zewnątrz w naturalnym procesie tzw. gutacji przez liście i korzenie [18].

#### **Przeciwciała monoklonalne otrzymanie w tytoniu**

Transgeniczny tytoń okazał się szczególnie przydatny do wytwarzania przeciwciał, co po raz pierwszy osiągnięto już w

1988 roku [16]. W wyniku ekspresji genów lekkiego i ciężkiego łańcucha IgG w odrębnych roślinach tytoniu i następnie krzyżowemu zapyleń uzyskując transgeniczne pokolenie F1, w którym zachodziła ekspresja obydwu genów i wytwarzanie pełnego przeciwciała IgG. Nieco później (1999r.) [38] uzyskano w tytoniu pełne IgG w drodze agroinfiltracji stosując równoczesne wprowadzenie genów łańcucha lekkiego i ciężkiego.

W celu otrzymania bardziej złożonego przeciwciała, jakim jest wydzielnica immunoglobulina A (SlgA) składająca się z dziesięciu łańcuchów peptydowych - 4 łańcuchów lekkich i tyleż ciężkich, łańcucha J i składnika wydzielnicznego S, Ma i współpracownicy [22] otrzymali najpierw 4 linie transgenicznego tytoniu, z których każdy wytwarzał jeden rodzaj łańcucha. W wyniku kolejnego krzyżowania tych linii otrzymano krzyżówkę tytoniu wytwarzającą pełne przeciwciała SlgA. Co ciekawe, okazało się, że synteza SlgA wymagająca współdziałania dwóch różnych typów komórek ssaczych, tj. komórek plazmatycznych i nabłonkowych, w przypadku tytoniu zachodzi w pojedynczej komórce. Metodą agroinfekcji uzyskano w tytoniu ekspresję fragmentów przeciwciał - jednołańcuchowych fragmentów zmiennych (scFv), podwójnego scFv (tzw. diabody), oraz białko infuzyjne składające się z diabody i interleukiny-2 [36]. W tytoniu, jako pierwszej roślinie, uzyskano ekspresję białka specyficznego jednołańcuchowego fragmentu zmiennego (bisFv), czyli łączącego się z dwoma różnymi epitopami antygeny [9]. Zastosowano transformację przejściową oraz trwałą komórek tytoniu w hodowli zawieszinowej jak również transformację trwałą roślin tytoniu. W każdym przypadku stosowano konstrukty genowe zawierające sekwencje liderowe ukierunkowujące ekspresję przeciwciała albo w RE, albo w apoplacie, albo w cytoplazmie. Przejściowa ekspresja zachodziła już po 3-ch dniach, najwyższa w RE, niższa w apoplacie, najniższa w cytosolu. W przypadku transgenicznych roślin poziom ekspresji wynosił 1,65% TSP. Opisanie doświadczenia wskazało na przydatność tytoniu do produkcji różnych form przeciwciał do celów terapeutycznych. Jednakże pojawił się problem dotyczący prawidłowej glikozylacji wytwarzanych przeciwciał, gdyż N-glikany roślinne różnią się znacznie od ludzkich brakiem kwasu siarowego i b-(1-4)- galaktozy oraz obecnością a-(1-3)- fukozy i b-(1-2)-ksylozy. Dwa ostatnie cukry nie mają wpływu na wiązanie antygeny i specyficzność, ale są potencjalnie immunogenne w przypadku wprowadzenia do krwioobiegu [2, 14, 15, 20]. Celem humanizacji N-glikanów skrzyżowano tytoń z ekspresją genu ludzkiej b-(1-4)- galaktotransferazy z tytoniem z ekspresją ciężkich i lekkich łańcuchów uzyskując krzyżówkę tytoniu produkującą w około 30 % przeciwciała z N-glikanami zakończonymi b-(1-4)-galaktozą [1] [Bakker et al. 2001]. Innym rozwiązaniem problemu właściwej glikozylacji białek jest inaktywacja ekspresji glikotransferaz alergicznych cukrów - fukozy i ksylozy lub zatrzymanie N-glikozylacji na etapie RE – powstaje wówczas N-glikan oligomannozowy podobny jak u człowieka z wydajnością blisko 100%. W tytoniu otrzy-

mano pełne glikozylowane przeciwciała przeciw wirusowi wścieklizny stosując transformację *Agrobacterium* z jednym plazmidem zawierającym geny łańcucha lekkiego i ciężkiego oraz sekwencję liderową KDEL (cztery aminokwasy), która zatrzymywała glikozylację na etapie ER. Powstałe przeciwciała z oligomannozowym N-glikanem wykazało właściwości biologiczne podobne jak przeciwciała wytwarzane w komórkach zwierzęcych [17, 19].

Otrzymywanie przynajmniej 3 przeciwciał w tytoniu osiągnięto zaawansowany stopień rozwoju, znajdują się one w badaniach klinicznych i mogą być niedługo wprowadzone na rynek [34] (Tabela II).

Pierwszym z nich jest wydzielnica immunoglobulina A (SlgA) „CaroRx” skierowana przeciw antygenowi powierzchniowemu bakterii – *Streptococcus mutans* – głównemu patogenowi odpowiedzialnemu za rozwój próchnicy zębów. Stosowanie tego preparatu polega na wyjąłowaniu jamy ustnej chloroheksydyną, a następnie polewaniu zębów preparatem immunoglobuliny przez około 2 tygodnie, co zapobiega rekolonizacji *S.mutans* przez 6 miesięcy do 1 roku. Drugim przeciwciałem (SlgA) jest „DoxoRx” przeznaczony do terapii miejscowej i doustnej objawów ubocznych chemioterapii Doxorubicyną i innymi lekami antracyklinowymi, takich jak wypadanie włosów (alopecia), stany zapalne jelit, jamy ustnej i przełyku. Stosowany miejscowo na skórę ma zapobiegać przede wszystkim wypadaniu włosów. Trzecie przeciwciała – „RhinoRx” jest właściwie połączeniem białka powierzchniowego ICAM-1 i wydzielnicy immunoglobuliny A (ICAM-1-SlgA) i przeznaczone jest do zapobiegania przeziębieniom spowodowanym infekcją wirusową. Jego działanie polega na zapobieganiu adhezji rinowirusów do komórek nabłonka nosa poprzez białko powierzchniowe ICAM-1 będące selektywnym receptorem dla tych wirusów. Stosowane ma być jako krople do nosa.

#### **Otrzymywanie szczepionek w tytoniu**

Tytoń jest szczególnie przydatny do otrzymywania szczepionek, przy czym w przypadku stosowania infekcji wirusem TMV są dwie możliwości. Produkt ekspresji (antygen) albo jest prezentowany na powierzchni kapsydu wirusa - otrzymuje się wówczas wysoko-immunogenne cząstki wirusowe albo jest wywarzany jako wolne, rozpuszczalne białko do tkanki roślinnej.

W tytoniu próbowano otrzymać szereg szczepionek antygenowych - podjednostkową szczepionkę przeciw cholerze (podjednostka B toksyny *Vibrio cholerae*), szczepionkę przeciwbiegunkową (podjednostka B zmiennocieplnej toksyny enteroksygeniczej *E.coli*), wirusowi Norwalk, cytomegalowirusowi (glikoproteina B) [6, 10, 11, 36], wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (białko powierzchniowe HBsAg *hepatitis B*) [35], wąglikowi, błonicy, tężcowi i wścieklicznie [19]. Niedawno w tytoniu z transformowanymi chloroplastami uzyskano wysoką ekspresję białka L1 kapsydu wirusa papilloma jako potencjalnej szczepionki antygenowej zapobiegającej rakowi szyjki macicy z wydajnością 3 mg/g świeżej masy, tj. 24% TSP, 240 mg w jednej roślinie [8].

Najbardziej zaawansowane stadia rozwoju dotyczą pięciu szczepionek [21, 30,32,33] (tabela II). Są to: białko TGF-Beta jako szczepionka przeciw rakowi jajnika, białko HN wirusa choroby Newcastle drobiu, która została dopuszczona do stosowania w 2006 r. jako pierwszy biofarmaceutyk wyprodukowany w roślinie, chociaż jako lek weterynaryjny, jednołańcuchowe fragmenty zmienne przeciwciała (scFv) jako szczepionka przeciwnowotworowa przeciw niezłazniczemu chłoniakowi złośliwemu (ang. *non Hodgkin's lymphoma*) oraz szczepionki antygenowe – parwowirusa kotów (ang. feline parvovirus) i wirusa brodawczaka ludzkiego (ang. *papilloma virus*).

### Zindywidualizowana terapia nowotworów

Możliwość szybkiej ekspresji w tytoniu obcych genów z wytworzeniem produktu z wysoką wydajnością przyczyniła się do opracowania postępowania szybkiego przygotowania leku specyficznego dla pojedynczego pacjenta. Przykładem jest sposób przygotowania szczepionki przeciwnowotworowej do terapii niezłazniczego chłoniaka złośliwego (ang. *non-Hodgkin's lymphoma* – NHL) [24, 25]. Z pobranych przez biopsję pacjenta rakowych limfocytów B otrzymuje się cDNA powierzchniowej immunoglobuliny Ig o charakterze antygeny rakowego. Po modyfikacji tego DNA polegającej na konstrukcji genu kodującego tylko fragmenty zmienne (Fv) łańcucha lekkiego i łańcuch ciężkiego Ig połączone krótkim linkerem peptydowym, wprowadza się go do genomu wirusa TMV, którym zakaża się tytoń. Podczas replikacji wirusa w tkance tytoniu powstają znaczne ilości jednołańcuchowego fragmentu zmiennego przeciwciała (scFv), który po wyodrębnieniu służy jako antyidiotypowa szczepionka, wywołująca odpowiedź immunologiczną analogiczną jak antygen powierzchniowy Ig. W podobny sposób można wytworzyć szczepionkę DNA niewymagającą przechowywania w lodówce. Z uwagi na pewien czas potrzebny do wytworzenia leku, taki sposób produkcji jest przydatny do indywidualnej terapii wolno rozwijających się nowotworów (jakim jest NHL). Stosując opisaną strategię możliwe jest otrzymanie zindywidualizowanej szczepionki przeciwnowotworowej w ciągu 6-10 tygodni od otrzymania materiału z biopsji [31].

### Otrzymywanie innych biofarmaceutyków w tytoniu

W tytoniu próbowano ekspresji szeregu biofarmaceutyków takich jak, insulina, somatotropina, erytropoetyna, czynnik wzrostu skóry, interferon b, glukocerebrozyda, białko C (antykoagulant), czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów, interleukiny (np. IL-10 [31]), a także inne białka użyteczne w medycynie, jak albumina osocza ludzkiego (Tabela II), hemoglobinę a i b i kolagen ludzki [20]. Jednym z bardziej interesujących eksperymentów była szybka i wydajna ekspresja ludzkiego hormonu wzrostu (somatotropiny) w liściach gatunku *Nicotiana benthamiana* [13]. Przeprowadzono transformację przejściową za pomocą infiltracji trzema populacjami rekombinowanego *Agrobacterium* każdy za-

wierający jeden z trzech różnych konstruktyw genowych, z których każdy zawierał gen somatotropiny i sekwencje wirusa roślinnego, natomiast konstrukty te różniły się sekwencjami ukierunkowującymi ekspresję w cytozolu, w chloroplastach i apoplazmie. Najwyższy poziom ekspresji wystąpił w apoplazmie – 10% TSP, co oznaczało, że z jednego liścia tytoniu można było uzyskać 20 mg somatotropiny.

### Podsumowanie

Tytoń wraz z deprecjacją wielowiekowej znaczenia jako źródło używek, w narastającym stopniu odgrywa nową rolę jako system ekspresyjny do otrzymywania cennych leków – biofarmaceutyków. Roślinę tę charakteryzują szerokie możliwości ekspresji różnego rodzaju białek terapeutycznych, nawet tak złożonych jak wydzielnicza immunoglobulina A. Kilka szczepionek i przeciwciał wytwarzanych w tytoniu jest bliskich wprowadzenia na rynek, a jedna szczepionka weterynaryjna została dopuszczona do stosowania. Pomimo wzrastającej konkurencji ze strony innych roślin uprawnych, tytoń wydaje się mieć przewagę jako najszybszy system wytwarzania szczepionek przeciwko chorobom infekcyjnym i nowotworowym łącznie ze zindywidualizowaną terapią nowotworową. Tytoń – roślina, która może wywołać raka, teraz może raka wyleczyć.

### Piśmiennictwo

1. Bakker H., Bardor M., Molthoff J.W. et al.: Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 2899.
2. Balen B., Krsnik-Rasol M.: N-glycosylation of recombinant therapeutic glycoproteins in plant systems. *Food Technol. Biotechnol.* 2007, 45, 1.
3. Bogorad L.: Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol.* 2000, 18, 257.
4. Daniell H., Khan M.S., Allison L.: Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 2002, 7, 84.
5. Daniell H., Kumar Sh., Dufourmantel N.: Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol.* 2005, 23, 238.
6. Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K.: Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 2001, 6, 219.
7. Decker E.L., Reski C.R.: Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2008, 31, 3.
8. Fernández-San Millán A., Ortiga S.M., Hervás-Stubbs S. et al.: Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.* 2008, 6, 427.
9. Fischer R., Schumann D., Zimmermann S. et al.: Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* 1999, 262, 810.
10. Fischer R., Stoger E., Schillberg S. et al.: Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004, 7, 152.
11. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A.: Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 1151.
12. Giddings G.: Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001, 12, 450.
13. Gils M., Kandzia R., Marillonnet S. et al.: High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol. J.* 2005, 3, 613.
14. Gomord V., P. Chamberlain R. Jefferis L., Faye: Biopharmaceutical production in plants: problems,

- solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* 2005, 23, 559.
15. Gomord V., Sourrouille Ch., Fitchette A.-C. et al.: Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol. J.* 2004, 2, 83.
  16. Hiatt A.C., Cafferkey R., Bowdish K.: Production of antibodies in plants. *Nature* 1989, 342, 76.
  17. Ko K., Tekoa Y., Rudd P.M. et al.: Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 8013.
  18. Komarnytsky S., Borisjuk N.V., Borisjuk L.G. et al.: Production of recombinant proteins in tobacco guttation fluid. *Plant Physiol.* 2000, 124, 927.
  19. Koprowski H.: Vaccines and sera through plant biotechnology. *Vaccine* 2005, 23, 1757.
  20. Larrick J.W., Yu L., Naftzger C. et al.: Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomol. Eng.* 2001, 18, 87.
  21. Ma J.K., Barros E., Bock R. et al.: Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep.* 2005, 6, 593.
  22. Ma J.K., Hiatt A., Hein M. et al.: Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 1995, 268, 658.
  23. Ma J.K.-C., Drake P.M.W., Christou P.: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* 2003, 4, 794.
  24. McCormick A.A., Reddy S., Reinl S.J. et al.: Plant-produced idiotypic vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 10131.
  25. McCormick A.A., Reinl S.J., Cameron T.I. et al.: Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *J. Immunol. Methods* 2003, 278, 95.
  26. Ramessar K., Capell T., Christou P.: Molecular pharming in cereal crops. *Phytochem. Rev.* 2008, 7, 579.
  27. Ramessar K., Sabala M., Capell T.: Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. *Plant Sci.* 2008, 174, 409.
  28. Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S. et al.: Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 522.
  29. Ruggiero F., Exposito J.Y., Bournat P. et al.: Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett.* 2000, 469, 132.
  30. Spök A., Twyman R.M., Fischer R. et al.: Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 506.
  31. Strona internetowa Checkbiotech: [http://greenbio.checkbiotech.org/news/tobacco\\_gets\\_new\\_healthy\\_image](http://greenbio.checkbiotech.org/news/tobacco_gets_new_healthy_image) (dostęp dnia 23 sierpnia 2009).
  32. Strona internetowa firmy Chlorogen: <http://www.gate2biotech.com/chlorogen-raises-million/> (dostęp dnia 23 sierpnia 2009).
  33. Strona internetowa firmy Large Scale Biology: [http://www.bioportfolio.com/biocorporate/6346-Large\\_Scale\\_Biology\\_Corporation.html](http://www.bioportfolio.com/biocorporate/6346-Large_Scale_Biology_Corporation.html) (dostęp dnia 28 sierpnia 2009).
  34. Strona internetowa firmy Planet Biotechnology: <http://www.planetbiotechnology.com/> (dostęp dnia 19 sierpnia 2009).
  35. Sunil Kumar G.B., Srinivas L., Ganapathi T.R., Bapat V.A.: Hepatitis B surface antigen expression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants using four different expression cassettes. *Plant Cell Tiss. Org.* 2006, 84, 315.
  36. Teli N.P., Timko M.P.: Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals *Plant Cell Tiss. Org.* 2004, 79, 125.
  37. Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S. et al.: Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 2003, 21, 570-578.
  38. Vaquero C., Sack M., Chandler J. et al.: Transient expression of a tumor-specific single chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999 96, 11128-11130.
  39. Yusibov V., Rabindran Sh., Commandeur U. et al.: The Potential of Plant Virus Vectors for Vaccine Production. *Drugs R & D.* 2006, 7, 203,