

# POTENCJAŁ APLIKACYJNY ROŚLIN TRANSGENICZNYCH W PRODUKCJI REKOMBINOWANYCH BIAŁEK O WŁAŚCIWOŚCIACH FARMAKOLOGICZNYCH

TRANSGENIC PLANTS AS A SOURCE OF RECOMBINANT  
PROTEINS WITH PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

Adrianna MICHALAK, Anna WDOWIKOWSKA

Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej,  
Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

*Streszczenie:* Rośliny genetycznie modyfikowane (GM) stanowią wydajną oraz bezpieczną platformę do produkcji rekombinowanych białek o przeznaczeniu terapeutycznym, przy relatywnie niskich nakładach zasobów kapitałowych. Dzięki roślinnym systemom ekspresji uzyskano już wiele różnych grup terapeutyków, w tym antygeny stanowiące podjednostki tradycyjnych oraz stosowanych doustnie szczepionek, przeciwciała, toksyny czy też enzymy. Wśród słabych stron roślinnego systemu produkcji rekombinowanych białek należy wymienić odmienny od typowego dla ssących komórek wzór glikozylacji białek, co może wywoływać niepożądaną immunogenność biofarmaceutyków. Uporanie się z niedoskonałościami roślinnego systemu ekspresyjnego skutkowało pojawieniem się na rynku pierwszego leku produkowanego z użyciem roślin GM – glukocerebrozydazy, stosowanej w leczeniu choroby Gaucher’a. Ponadto na zaawansowanych etapach badań klinicznych znajduje się obecnie szereg potencjalnych leków. Co więcej, dostrzeżono potencjał aplikacyjny roślin transgenicznych w walce z wirusem SARS-CoV-2, który wywołał pandemię w 2019 roku. W związku z powyższym, w niniejszej pracy przedstawiono molekularne aspekty tworzenia platform ekspresyjnych opartych o rośliny genetycznie modyfikowane, wraz z opisem silnych i słabych stron tego systemu. Opisano także najnowsze dane dotyczące badań klinicznych rekombinowanych białek terapeutycznych produkowanych w roślinach. Aż wreszcie przedstawiono możliwe aspekty użycia roślin GM w walce z wirusem SARS-CoV-2.

*Słowa kluczowe:* rośliny transgeniczne, biofarmaceutyki, bioreaktory, roślinny system ekspresji, wirus SARS-CoV-2

*Summary:* Genetically modified (GM) plants are considered as low-cost, efficient, and safe platform for production of recombinant proteins with pharmacological properties. With the use of plant expression systems, many different groups of therapeutics have already been obtained, including antigens constituting subunits of traditional and *per os* vaccines, antibodies, toxins, or enzymes. Among disadvantages of this system, it should be mentioned that the glycosylation pattern of proteins differs from that typical of mammalian cells, which may induce undesirable immunogenicity of biopharmaceuticals. Up to now only one drug is produced with the use of GM plants – glucocerebrosidase, used in the treatment of Gaucher's disease. However, a number of potential drugs are currently at advanced stages of their clinical trials. Moreover, the application of transgenic plants in the fight against the SARS-CoV-2 virus has been noticed. Therefore, this paper presents the molecular aspects of creating expression platforms based on genetically modified plants, along with a description of the advantages and disadvantages of this system. The latest clinical trials data of recombinant therapeutic proteins produced in plants are also described. Finally, the possible aspects of the use of GM plants in the fight against the SARS-CoV-2 virus have been presented.

*Keywords:* transgenic plants, bioreactors, plant expression system, virus SARS-CoV-2

## WSTĘP

Przez wiele wieków wiedza na temat zastosowania roślin w medycynie rosła. Naukowcy stale odkrywają nowe związki pochodzenia roślinnego oraz ich wszechstronne zastosowanie terapeutyczne. Powstanie przed kilkudziesięciami laty inżynierii genetycznej, umożliwiającej manipulację genami oraz transformację komórek, następnie zsekwencjonowanie ludzkiego genomu, nakreśliło nowe możliwości wykorzystania roślin jako systemów ekspresyjnych. Współcześnie rośliny genetycznie modyfikowane (GM) uznawane są za alternatywę dla bakteryjnych, drożdżowych systemów ekspresyjnych oraz ssaczych linii komórek w produkcji białek heterologicznych. Coraz częściej wskazuje się rośliny transgeniczne jako źródło zróżnicowanych białek rekombinowanych o właściwościach farmakologicznych [37]. Dlatego celem niniejszej pracy jest przybliżenie molekularnych aspektów tworzenia platform ekspresyjnych z zastosowaniem roślin GM, porównanie genetycznie modyfikowanych roślin oraz pozostałych najczęściej stosowanych organizmów jako źródła rekombinowanych białek wykorzystywanych w medycynie. W pracy poruszane są także aspekty wykorzystania roślinnych systemów ekspresji w walce z wirusem SARS-CoV-2, który w 2019 spowodował pandemię COVID-19 na całym świecie.

## OPTIMALIZACJA PROCESU PRODUKCJI BIAŁEK W ROŚLINACH GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH

Roślinne kultury *in vitro* w tzw. bioreaktorach oraz uprawa transgenicznych odmian roślin w szklarniach lub na polu w kontrolowanych warunkach to najpowszechniejsze kierunki wykorzystania roślin w przemyśle biotechnologicznym

[12]. Popularna stała się koncepcja upraw molekularnych, polegająca na odpowiednim przygotowaniu roślin do produkcji białek o znaczeniu farmakologicznym i przemysłowym na szeroką skalę [50]. Produkcja białek rekombinowanych z wykorzystaniem roślin GM wymaga starannego zaplanowania całego procesu i obejmuje wybór gatunku rośliny-gospodarza i metody transformacji rośliny oraz kasyety ekspresyjnej wraz z przygotowaniem wektora do transformacji. Na wczesnych etapach planowania uwzględnia się ponadto przyszłą lokalizację ekspresji białka rekombinowanego w obrębie poszczególnych tkanek rośliny [17]. Regulacja ekspresji transgenów w przypadku produkcji białek rekombinowanych jest złożonym, wieloetapowym procesem. Aby zapewnić wydajną ekspresję białek w transgenicznej roślinie, konieczna jest optymalizacja każdego z etapów procesu na poziomie molekularnym. Optymalizacja ta obejmuje zagadnienia takie jak wybór promotora, otrzymanie stabilnego transkryptu oraz uzyskanie wydajnego procesu translacji. Sortowanie białka do odpowiednich kompartmentów oraz ich akumulacja stanowią kluczowe etapy dla uzyskania efektywnej produkcji białek heterologicznych [35].

### SELEKCJA ODPOWIEDNIEGO GATUNKU ROŚLINY JAKO PLATFORMY PRODUKCYJNEJ

Wybór rośliny-gospodarza jest kluczowym czynnikiem determinującym sukces całego procesu produkcji biofarmaceutyków. Roślina taka stanowić będzie platformę ekspresji oraz akumulacji rekombinowanych białek. Czynniki ekonomiczne to główne aspekty rozważane podczas wyboru rośliny i zazwyczaj planując proces produkcyjny jako pierwsze poddaje się je pod rozważanie [50]. Czynniki te obejmują zagadnienia takie jak biomasa plonów, właściwości ich przechowywania czy łatwość transportowania, wartość produkowanego rekombinowanego białka *per se*, koszty kapitałowe zasobów niezbędnych do rozpoczęcia produkcji, koszty utrzymania hodowli, wymagana powierzchnia uprawy transgenicznych roślin, jadalność, długość cyklu produkcyjnego, a także łatwość transformacji oraz regeneracji [15, 63]. Co więcej, gatunki roślin samopylnych są bardziej pożądane niż te, które wymagają zapylenia krzyżowego, ze względu na konieczność ograniczenia rozpowszechniania pyłku pochodzącego z roślin GM. Mając to na uwadze w wielu przypadkach wybierane są gatunki, których uprawę można przeprowadzić w warunkach izolacji, na przykład pomidory hodowane w szklarniach [17]. Do gatunków roślin najczęściej wykorzystywanych do produkcji białek heterologicznych należą *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Vigna unguiculata*, *Zea mays*, *Daucus carota* oraz *Solanum lycopersicum* [49, 17].

Jednymi z częściej wybieranych tkanek roślinnych w celu ekspresji i akumulacji białka heterologicznego są zielone części rośliny, zazwyczaj liście oraz tkanki łodygi. Konstytutywna ekspresja transgenu w tych organach jest relatywnie prosta do osiągnięcia, a poziom biosyntezy białka bardzo wysoki [17]. Główną

wadą związaną z wyborem zielonych organów jest ich krótki okres trwałości po zebraniu, co wiąże się z koniecznością przeprowadzenia możliwie jak najszybszego procesu ich przetworzenia i oczyszczenia białek rekombinowanych [15]. Utrudniony jest też sam proces izolacji transgenicznego białka z tkanek zielonych ze względu na skomplikowany i żmudny proces oczyszczania masy liści ze specyficznych związków, takich jak barwniki, alkaloidy i inne metabolity wtórne [17]. Podatność na szereg technik transformacji oraz łatwość regeneracji czynią rośliny z rodzaju *Nicotiana*, główną platformę produkcji biofarmaceutyków w liściach [71]. Tytoń posiada również większość cech pożądaných z ekonomicznego punktu widzenia, np. wysoki poziom biomasy plonów, możliwość zwiększania skali produkcji, dokładnie opracowane protokoły transformacji czy całoroczny wzrost oraz zbiór plonów [64, 67]. Liczne zalety roślin z gatunków *N. tabacum* oraz *N. benthamiana* sprawiają, że są one najczęściej wybieranymi roślinami w uprawach molekularnych w celu produkcji najistotniejszych z medycznego punktu widzenia białek, takich jak przeciwciała, szczepionki czy cytokiny [10, 71]. Jednakże tytoń zawiera duże ilości toksycznych substancji, jak nikotyna czy inne alkaloidy, które muszą zostać usunięte w trakcie procesu oczyszczania biofarmaceutyków z tkanek rośliny [50]. Ze względu na żmudny proces oczyszczania białek rekombinowanych z liści oraz negatywną opinię społeczeństwa odnośnie tytoniu jako szkodliwej używki, poszukiwane są alternatywne systemy ekspresji dla produkcji i akumulacji biofarmaceutyków w liściach. Obecnie jako bioreaktory dla upraw molekularnych eksplorowane są rośliny takie jak lucerna siewna (*Medicago sativa*) czy sałata siewna (*Lactuca sativa*) [59].

Nasiona także są często wybierane jako miejsce ekspresji oraz akumulacji białek rekombinowanych. Szczególnie dotyczy to gatunków roślin, których nasiona gromadzą znaczne ilości białek. Transgen wprowadza się na wektorach pod kontrolą promotorów specyficznych dla nasion, gwarantując wysoki poziom biosyntezy białka. Proces oczyszczania białek z tkanek nasion jest znacznie mniej skomplikowany niż w przypadku liści. Ponadto, białka mogą być przechowywane w nasionach w temperaturze otoczenia przez dłuższy czas [35]. Wadą przy wykorzystaniu tego organu jest długi czas oczekiwania na wytworzenie nasion przez roślinę, w zależności od jej cyklu życiowego. Wśród roślin, których nasiona najczęściej stosuje się w uprawach molekularnych znajduje się soja (*Glycine max*) [49], a także ryż (*Oryza sativa*), pszenica (*Triticum aestivum*) oraz kukurydza (*Zea mays*) [34]. Jadalna szczepionka Muco-Rice CTB przeciwko wirusowi cholery, wyprodukowana w ryżu, wykazuje stabilność w temperaturze pokojowej przez 8 miesięcy, co więcej jest odporna na trawienie pepsyną [48]. Natomiast rekombinowana szczepionka przeciw enterotoksynogennemu szczepowi pałeczki okrężnicy, stworzona za pośrednictwem nasion soi, pozostaje stabilna przez okres 4 lat [49].

Szczególnym znaczeniem dla produkcji leków rekombinowanych wykazuje się mech *Physcomitrella patens*, który posiada ugruntowany status organizmu

modelowego w badaniach nad ewolucją, rozwojem i fizjologią roślin. *Physcomitrella patens* jest rośliną, w której z powodzeniem wycisza się geny kodujące białka szlaku glikozylacji metodą “knock-out” [11]. Zaletą mchów jest także relatywnie niski koszt hodowli w fotobioreaktorach lub na szalkach Petriego. Ponadto komórki, a także całe tkanki *P. patens* charakteryzują się wysoką zdolnością regeneracji po zastosowaniu procedury transformacji genetycznej [70].

Przy rozważaniu wykorzystania roślin w produkcji białek o znaczeniu terapeutycznym lub diagnostycznym warto wspomnieć o kulturach *in vitro* komórek roślinnych, które to posiadają większość zalet roślinnych systemów ekspresyjnych, a w szczególności możliwość produkowania skomplikowanych białek, które są prawidłowo glikozylowane oraz fałdowane bez ryzyka kontaminacji patogenami czy endotoksynami [75]. Chociaż kultury komórek roślinnych nie zapewniają produkcji na tak szeroką skalę jak uprawa całych transgenicznych roślin na polach, to pozbawione są szeregu problemów charakterystycznych dla konwencjonalnych upraw, związanych ze zmiennością pogody, szkodnikami, glebą czy przepływem genów do środowiska [57]. Ze względu na krótki cykl wzrostu komórek w zawieszonych kulturach, czas potrzebny do wyprodukowania rekombinowanych białek z ich użyciem liczony jest w dniach lub tygodniach, w odróżnieniu od miesięcy, które zajmuje produkcja w całych transgenicznych roślinach [79]. Hodowanie komórek roślinnych w sterylnych i kontrolowanych warunkach *in vitro* umożliwia dokładny nadzór nad warunkami wzrostu komórek, użycia promotorów indukowanych chemicznie czy wektorów wirusowych [78, 75]. Kultury komórek roślinnych dają możliwość sekrecji rekombinowanych białek bezpośrednio do podłoża, co wiąże się z niskim kosztem przetwarzania i oczyszczania produkowanych białek. Częściowo rekompensuje to niski uzysk białek rekombinowanych produkowanych w hodowlach *in vitro* komórek roślinnych i związane z tym wysokie koszty kapitałowe [57, 62]. Najczęściej używane linie komórek roślinnych w celu produkcji biofarmaceutyków otrzymywane są z kalusa siewek tytoniu [79]. Linie te posiadają pożądane cechy takie jak szybki wzrost, synchronizację cyklu komórkowego oraz łatwość transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* [53, 87]. Inne szeroko stosowane linie komórek roślinnych pochodzą z jadalnych gatunków takich jak ryż (*Oriza sativa*), soja (*Glycine max*), lucerna siewna (*Medicago sativa*), marchew (*Daucus carota*) czy pomidor (*Lycopersicon esculentum*) [79]. Linie komórek marchwi (*D. carota*) są używane przez firmę Protalix w celu produkowania ludzkiej glukocerebrozydazy, która jest pierwszym biofarmaceutykiem produkowanym z użyciem roślinnego systemu ekspresyjnego zaakceptowanym do wypuszczenia na rynek [66].

## WYBÓR PROMOTORA DO KASETY EKSPRESYJNEJ

W osiągnięciu wysokiego poziomu transkrypcji transgeny ważną rolę odgrywają siła oraz profil inicjacji transkrypcji, co osiąga się poprzez zastosowanie

odpowiedniego promotora. Promotory konstytutywne indukują ekspresję genów niezależnie od środowiska komórki, pozwalając na ciągłą syntezę białka we wszystkich tkankach roślinnych. Przykładami promotorów konstytutywnych stosowanych do produkcji białek w roślinach jest promotor CaMV 35S wirusa mozaiki kalafiora charakterystyczny dla roślin dwuliściennych oraz promotor ubikwityny-1 z kukurydzy dla jednoliściennych [74]. Promotor CaMV 35S jest z powodzeniem wykorzystany do produkcji antygenów, m.in. podjednostki B toksyny cholery (CTB) [31], czy glikoproteiny S wirusa SARS [36]. Szereg białek, przykładowo aprotynina [80], czy antygen powierzchniowy WZW B (HBsAg) [33] zostały wyprodukowane w roślinnych systemach ekspresyjnych przy użyciu promotora ubikwityny-1. Jednakże konstytutywna ekspresja rekombinowanego białka może negatywnie oddziaływać na plony i prowadzić do ograniczenia wzrostu transformowanych roślin [27]. Alternatywnym rozwiązaniem jest stosowanie promotorów specyficznych, wykorzystywanych w celu regulacji ekspresji transgenów w tkankach lub organach takich jak: bulwa, nasiona bądź owoce [74]. Przykładem promotora specyficznego jest promotor gluteliny ryżu GluA-2 (Gt-1), który zapewnia specyficzną ekspresję w nasionach ryżu oraz kukurydzy [77]. Najwydajniejszą zaś produkcję białek rekombinowanych w nasionach roślin umożliwiają promotory lektyny i glicytyny soi, leguminy groszku (legA) oraz nieznanego białka nasion bobu (ang. *unknown seed protein*; USP) [61, 46, 35].

Działanie promotorów może być wspomagane szeroko pojętymi czynnikami transkrypcyjnymi, które działają jako wzmacniacze aktywności promotorów [50]. Przykładem są regiony przyłączenia macierzy jądrowych (MAR), które mogą oddziaływać z regulatorowymi białkami macierzy jądrowej, stanowiąc element regulatorowy *cis* w selektywnej ekspresji genów [73]. MAR łączą się z sąsiednimi loci regionów, w których znajdują się sekwencje odpowiedzialne za rekrutację czynników transkrypcyjnych dla promotorów [17].

### WZMACNIANIE STABILNOŚCI REKOMBINOWANEGO BIAŁKA

Najważniejsze z technik pozwalających na zwiększenie stabilności oraz akumulacji rekombinowanego białka jest jego kierowanie do stabilnego przedziału komórkowego lub fuzja z innym białkiem, cechującym się wysoką stabilnością [3]. Rekombinowane białka kodowane przez transgeny integrujące się z genomem jądrowym mogą być kierowane do określonych kompartmentów komórki takich jak chloroplasty, mitochondria, wakuole, oleosomy czy apoplast [35]. Kierowanie białek rekombinowanych na drogę sekrecji skutkuje znacznym zwiększeniem wydajności upraw, niż ma to miejsce w przypadku ich akumulacji w cytozolu [72]. Można to osiągnąć poprzez dołączenie peptydowej sekwencji sygnałowej do N-końca białka kodowanego przez transgen, co sprawia, iż powstające białko jest kotranslacyjnie przenoszone do systemu endomembranowego [8]. Białko skierowane na szlak sekrecyjny migruje przez retikulum endoplazmatyczne oraz aparat

Golgiego, aż do osiągnięcia macierzy zewnątrzkomórkowej lub wakuoli w przypadku obecności wakuolarnej sekwencji sygnałowej w pierwotnej sekwencji białka [3]. Białka rekombinowane trafiające do ER mogą zostać w nim zatrzymane, między innymi poprzez dołączenie do C-końca sekwencji sygnałowej (K/H)DEL, zatrzymującej białka w ER [43]. Taki zabieg wpływa pozytywnie na stabilizację białka, co zaobserwowano w przypadku produkcji w roślinnych systemach ekspresyjnych m.in. antygenowego białka S koronawirusa SARS [58].

Kompartenty komórki roślinnej takie jak jądro komórkowe czy chloroplasty również są wybierane jako lokalizacja akumulacji białek rekombinowanych. Nie trwała termicznie toksyna Lt-B pochodząca z enterotoksygennego szczepu *E. coli* wykazywała większy poziom akumulacji w ziarnach kukurydzy po zmianie jej posttranslacyjnej lokalizacji z cytozolu na jądro komórkowe, poprzez dodanie jądrowego sygnału lokalizowania wirusa SV40 [69]. Ksylanaza pochodząca z grzyba *Trichoderma reesei* wykazywała wysoki poziom akumulacji w liściach *A. thaliana*, gdy kierowano ją do chloroplastów, wykorzystując sekwencję sygnałową aktywazy RuBisCo [28]. W stromie chloroplastów zachodzą pewne modyfikacje posttranslacyjne takie jak multimeryzacja czy formowanie mostków disiarczkowych [9], co sprawia, iż stroma chloroplastów stanowi odpowiednie środowisko dla białek, które nie wymagają dla swojej aktywności skomplikowanych modyfikacji, na przykład glikozylacji, typowej dla ścieżki sekrecyjnej [3].

Fuzja białka rekombinowanego z innym białkiem stabilizującym może również okazać się pomocna we wzmacnianiu stabilności czy poprawnego fałdowania.  $\beta$ -glukuronidaza, lucyferaza czy podjednostka toksyny B cholery osiągnęły wysoki poziom akumulacji w liściach transgenicznego tytoniu czy ziemniaka po fuzji z ubikwityną [45].

## PORÓWNANIE SYSTEMÓW EKSPRESYJNYCH STOSOWANYCH W PRODUKCJI BIOFARMACEUTYKÓW

Wśród ogromu możliwości jakie niosło za sobą opracowanie metody klonowania genów jak również transformacji genetycznej, wyłoniła się idea produkcji w bakteriach transgenicznych ludzkich białek o przeznaczeniu terapeutycznym. Pierwszymi ludzkimi białkami, które z powodzeniem produkowano w komórkach bakterii *E. coli* były insulina oraz somatostatyna [29, 20]. W 1982 roku na rynku pojawiła się rekombinowana insulina – pierwszy lek opracowany z wykorzystaniem zmodyfikowanych genetycznie bakterii [18]. Kolejnym osiągnięciem tej dziedziny nauki była pierwsza udana ekspresja ludzkich przeciwciał w transgenicznym tytoniu *Nicotiana tabacum* [26]. Równolegle opracowywano platformy do produkcji biofarmaceutyków, które oparte były na liniach genetycznie modyfikowanych komórek ssaków, grzybów czy innych niż *E. coli* gatunkach bakterii. Systemy te do dziś posiadają ugruntowaną po-

zycję jako szeroko stosowane platformy ekspresji rekombinowanych białek o właściwościach terapeutycznych. Szybko zauważono jednak, że roślinne systemy ekspresji heterologicznych białek posiadają szereg potencjalnych zalet, które sprawiają, iż są one bardziej wydajne w porównaniu z pozostałymi systemami [26]. Porównanie zalet i wad linii genetycznie modyfikowanych komórek ssaków, grzybków, bakterii oraz roślinnych systemów ekspresji białek rekombinowanych przedstawiono w **tabeli 1**.

**TABELA 1** Porównanie systemów ekspresyjnych stosowanych w celu produkcji rekombinowanych białek. Na podstawie [67]

**TABLE 1** Comparison of expression systems used for recombinant protein production. Table is based on [67]

<b>System ekspresyjny</b>	<b>Zalety</b>	<b>Wady</b>
<b>Bakterie</b>	<p>Wysoki poziom ekspresji            Krótki czas realizacji produkcji            Niskie koszty produkcji            Łatwość zwiększania skali produkcji            Łatwość manipulacji genetycznych            Ugruntowane procedury regulacyjne</p>	<p>Brak modyfikacji potranslacyjnych            Nieprawidłowe fałdowanie rekombinowanych białek            Wysokie ryzyko kontaminacji endotoksynami bakteryjnymi</p>
<b>Drożdże</b>	<p>Szybki wzrost oraz możliwość zwiększania skali produkcji            Łatwość manipulacji genetycznych            Niedrogie podłoża hodowlane            Nieskomplikowane warunki hodowli            Obecność niezbędnych modyfikacji potranslacyjnych</p>	<p>Nieprawidłowy wzór glikozylacji ekspresjonowanych białek            Utrudniona dezintegracja komórek – obecność twardej i grubej ściany komórkowej</p>
<b>Kultury ssaczyc komórek</b>	<p>Prawidłowe fałdowanie oraz szlaki modyfikacji potranslacyjnych produkowanych białek            Ugruntowane procedury regulacyjne</p>	<p>Wysokie koszty produkcji            Ryzyko kontaminacji ssaczyci wirusami, prionami oraz onkogennym DNA</p>
<b>Transgeniczne rośliny</b>	<p>Krótki czas produkcji białek rekombinowanych            Niskie koszty utrzymania hodowli            Zoptymalizowane warunki wzrostu            Brak zanieczyszczeń szkodliwymi dla ludzi patogenami            Łatwość zwiększenia skali produkcji            Modyfikacje potranslacyjne niemal identyczne jak w systemach ssaczyc</p>	<p>Brak ugruntowanych procedur regulacyjnych            Odmienność od ssaczego szlak glikozylacji białek</p>



Systemy ekspresyjne oparte o transgeniczne drożdże, bakterie czy też linie ssaczych komórek obarczone są wadami, których nie obserwuje się w przypadku produkcji biofarmaceutyków w roślinach GM. Przykładem może być brak lub niskie ryzyko zanieczyszczenia biofarmaceutyków podczas produkcji w roślinach GM szkodliwymi dla zdrowia ludzi patogenami, takimi jak wirusy czy endotoksyny bakteryjne [1]. Transgeniczne rośliny mogą stanowić platformę do ekspresji białek, które nie mogą być wydajnie produkowane w liniach ssaczych komórek ze względu na swoją cytotoksyczność. Takim przykładem jest wiskumina, która jest lektyną o właściwościach antynowotworowych [81]. Co więcej, roślinne platformy ekspresyjne łączą zalety systemów opartych o eukariotyczne komórki, w których zachodzą odpowiednie modyfikacje potranslacyjne białek, a także zalety systemów bakteryjnych, które cechuje niski stopień komplikacji oraz niskie koszty kapitałowe. Aspekty ekonomiczne stanowią jedną z najważniejszych determinantów wyboru systemu ekspresyjnego białka podczas projektowania procesu produkcji. Rośliny GM jako bioreaktory wymagają najniższego udziału zasobów kapitałowych w porównaniu z pozostałymi systemami [23]. Wiąże się to, po pierwsze, z łatwością przeniesienia upraw roślin GM do wielotonowej skali, z laboratorium na pola czy też do szklarni, gdzie powierzchnia uprawy może zajmować nawet kilka tysięcy hektarów. Drugim aspektem jest niski koszt magazynowania oraz transportu roślin GM, które można przechowywać w temperaturze pokojowej, natomiast warunki dla pozostałych systemów są znacznie bardziej rygorystyczne: dla drożdży i bakterii wymagana jest temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$ , a kultury ssaczych komórek muszą być przechowywane w ciekłym azocie [14].

Kolejną zaletą roślinnych platform ekspresyjnych jest relatywnie krótki odcinek czasu od rozpoczęcia procesu produkcji do uzyskania kompletnego biofarmaceutyku. Zastosowanie transformacji roślin z wykorzystaniem metody infiltracji z *Agrobacterium* i/lub wprowadzenia wektorów wirusowych umożliwia osiągnięcie przejściowej ekspresji rekombinowanych białek nawet w 8 tygodni po otrzymaniu odpowiadającej białku sekwencji DNA [55, 19]. Możliwość skrócenia czasu potrzebnego do wyprodukowania biofarmaceutyków pozwala na produkcję tak zwanych „szczepionek szybkiej odpowiedzi”. Szczepionki takie wykorzystywane są w obliczu epidemii w związku z koniecznością niezwłocznego opracowania terapii skierowanej przeciw patogenowi, dla którego brak jest skutecznej terapii lub w przypadku, gdy epidemia została wywołana przez nowy, nieznany dotychczas szczep patogenu. W przeszłości, w celu uzyskania szybkiej i skutecznej terapii wykorzystano transgeniczny tytoń (*N. benthamiana*), w którym uzyskano ekspresję grupy przeciwciał skierowanych przeciw wirusowi Ebola, a następnie podawano w formie koktajlu w trakcie epidemii gorączki krwotocznej w 2014 roku w Zachodniej Afryce [38].

## PROBLEMY ZWIĄZANE Z N-GLIKOZYLACJĄ SSACZYCH BIAŁEK W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Jedną z najistotniejszych właściwości roślinnych platform ekspresyjnych dla produkcji biofarmaceutyków jest możliwość przeprowadzenia w roślinnych komórkach większości modyfikacji potranslacyjnych. Modyfikacje te są niezbędne dla poprawnego fałdowania białka, a to z kolei jest konieczne dla otrzymania stabilnych oraz aktywnych na wskazanym poziomie ssaczych białek. Dzięki temu w roślinnych platformach ekspresyjnych z powodzeniem dokonuje się ekspresji białek o skomplikowanej strukturze, na przykład przeciwciał monoklonalnych czy też białek błonowych [63, 25]. Z drugiej strony różnice występujące w szlaku N-glikozylacji białek w komórkach roślinnych oraz ssaczych stanowią jedno z największych wyzwań w produkcji biofarmaceutyków z zastosowaniem transgenicznnych roślin. N-glikany, które charakterystyczne są dla komórek roślinnych sprawiają, że ssacze glikoproteiny produkowane w roślinnych systemach ekspresyjnych posiadają właściwości immunogenne, a także mogą nie wykazywać pożądanej bioaktywności. Aplikacja pacjentowi biofarmaceutyku, który posiada inny niż ssaczy wzór N-glikozylacji, skutkować może wystąpieniem reakcji alergicznej, a nawet wstrząsem anafilaktycznym [22].

Proces N-glikozylacji w komórkach eukariotycznych rozpoczyna dołączenie oligosacharydowego prekursora do reszty asparaginy, w obrębie specyficznej sekwencji Asn-X-Ser/Thr (gdzie X oznacza dowolny aminokwas z wyłączeniem proliny). Wraz z transportem powstałej glikoproteiny przez szlak sekrecyjny, N-glikan poddawany jest szeregowi reakcji dojrzewania. Początkowe etapy N-glikozylacji zachodzące w ER są wspólne dla roślin i zwierząt, jednak różnice pojawiają się podczas syntezy białka w aparacie Golgiego (AG), gdzie enzymy zwane glikozylotransferazami przyłączają oligocukrowe reszty do wybranych aminokwasów łańcucha białkowego poprzez utworzenie wiązań glikozydowych [35]. Główne różnice polegają na tym, że w AG komórek ssaków fukoza dołączana jest do cukrowego łańcucha wiązaniem  $\alpha(1,6)$  oraz terminalnie dołączany jest kwas sjałowy, natomiast u roślin do rdzenia cukrowego dołączana jest ksyloza wiązaniem  $\beta(1,2)$ , a fukoza wiązaniem  $\alpha(1,3)$  [21]. W celu pokonania przeszkód związanych z brakiem bioaktywności oraz immunogennością produkowanych biofarmaceutyków na skutek nieprawidłowego wzoru glikozylacji, opracowano roślinne systemy ekspresji umożliwiające przeprowadzenie autentycznego szlaku glikozylacji rekombinowanych białek, typowego dla komórek ludzkich [24, 42].

Jedną z metod obejmuje fuzję sekwencji sygnałowej KDEL zatrzymującej białko w świetle ER, wraz z sekwencją kodującą białko heterologiczne, co pozwala na ograniczenie glikozylacji przeciwciał produkowanych w roślinie do wyłącznie przyłączania N-glikanu o wysokiej zawartości mannozy [16]. Kolejną strategią opartą jest na hamowaniu roślinnych glikozylotransferaz, które odpo-

wiedzialne są za dojrzewanie N-glikanu w AG [54]. Usunięcie genów kodujących  $\alpha(1,3)$ -fukozylotransferazy oraz  $\beta(1,2)$ -ksylozylotransferazy u *Physcomitrella patens* skutecznie zapobiegło produkcji specyficznych dla roślin glikoepitopów bez oddziaływania na proces sekrecji białka heterologicznego przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na wzrost roślin [32]. W celu zahamowania roślinnych glikozylotransferaz wykorzystano z powodzeniem interferujące RNA (RNAi) u gatunków takich jak *Lemna minor*, *Nicotiana benthamiana*, *Medicago sativa*, a także *Oryza sativa*. Badania profilu N-glikozylacji rekombinowanych glikoprotein pochodzących z roślin, u których zahamowano swoiste glikozylotransferazy, wykazały znaczny spadek zawartości  $\alpha(1,3)$ -fukozy oraz  $\beta(1,2)$ -ksylozy w łańcuchach oligosacharydowych [60]. Wśród najnowszych osiągnięć z zakresu glikoinżynierii należy wymienić usunięcie techniką knock-out'u dwóch genów  $\beta(1,2)$ -ksylozylotransferazy oraz 4/5 genów  $\alpha(1,3)$ -fukozylotransferazy u *N. benthamiana* poprzez zastosowanie systemu edycji genomu CRISPR/Cas9 przez dwie niezależne grupy badaczy w 2017 roku [24, 42].

Ponadto w celu przeprowadzenia szlaku N-glikozylacji w komórkach roślinnych możliwie jak najbardziej zbliżonego do tego, który ma miejsce w komórkach ludzkich, dokonano transformacji roślin wektorem niosącym geny kodujące ssacze glikozylotransferazy oraz kodujące enzymy odpowiedzialne za sjalicylację produkowanych białek [60]. Z sukcesem dokonano ekspresji ludzkich enzymów  $\beta(1,4)$ -galaktozylotransferazy oraz  $\alpha(1,6)$ -fukozylotransferazy w *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją genów kodujących roślinne glikozylotransferazy [6, 68]. Brak kwasu sjalowego w N-glikanach ludzkich glikoprotein może powodować ograniczenie ich funkcjonalności [30]. U niektórych gatunków roślin wprawdzie kwas sjalowy występuje w wolnej postaci, jednakże nie jest on dołączany do syntezowanego łańcucha oligocukrowego na szlaku N-glikozylacji. Ponadto w komórkach roślinnych nie występują enzymy szlaku biosyntezy CMP-kwas sjalowy, który stanowi aktywowaną formę kwasu sjalowego, enzymu odpowiedzialnego za transport CMP-kwas sjalowy z cytoplazmy do aparatu Golgiego, a także enzymu  $\alpha(2,6)$ -sialylotransferazy, który odpowiada za przyłączenie CMP-kwas sjalowy do N-glikanu w komórkach ludzi [60]. Aby umożliwić produkcję w transgenicznych roślinach ludzkich białek, które wymagają sjalicylacji, dokonano koekspresji trzech ludzkich enzymów niezbędnych do syntezy aktywowanej formy kwasu sjalowego (CMP-kwas sjalowy) u *Arabidopsis thaliana*. W efekcie zaobserwowano w komórkach transformowanych roślin obecność znaczących ilości CMP-kwas sjalowy jak i wolnego kwasu sjalowego [7]. Kolejnym krokiem na drodze do sjalicylacji N-glikanów ludzkich białek produkowanych w roślinach GM była synteza enzymu transportującego do AG, a także przyłączającego CMP-kwas sjalowy do łańcucha oligocukrowego. W tym celu do komórek *N. benthamiana* ( $\Delta$ XT/FT) wprowadzono sześć ludzkich genów, które kodują wszystkie niezbęd-

ne enzymy znajdujące się na szlaku biosyntezy, transportu oraz przyłączenia CM-P-kwas sjałowy do N-glikanu. Przejściowa superekspresja powyższych sześciu genów w tytoniu wraz z równoległą ekspresją przeciwciał monoklonalnych 2G12 stosowanych przeciw wirusowi HIV-1, skutkowałą produkcją w pełni funkcjonalnych przeciwciał, których N-glikany pozbawione były roślinnych glikoepitopów, a także zawierały cząsteczki kwasu sjałowego. Udowodniono, że przeciwciała wyprodukowane w ten sposób posiadają taką samą zdolność do neutralizacji wirusa HIV w warunkach *in vitro*, jak przeciwciała C2G12 produkowane z użyciem ssaczych linii komórkowych [41].

## **PRZEGLĄD REKOMBINOWANYCH BIAŁEK TERAPEUTYCZNYCH PRODUKOWANYCH W ROŚLINACH**

Pośród białek o zastosowaniu farmakologicznym, które produkowane są w roślinach transgenicznych należy wymienić przeciwciała oraz ich pochodne, w tym wydzielnicze immunoglobuliny A (sIgA), immunoglobuliny klasy M (IgM) oraz klasy G (IgG), podjednostki szczepionek, jak również cząsteczki wirusopodobne (ang. virus-like particles, VLP), terapeutyczne enzymy czy też toksyny [38]. Obecnie jedynym dostępnym na rynku lekiem wyprodukowanym z wykorzystaniem roślinnego systemu ekspresyjnego jest enzym glukocerebrozydaza, stosowany w przypadku choroby Gaucher'a [65]. Lek został zaakceptowany przez amerykańską Agencję Żywności i Leków w 2012 roku. Zestawienie biofarmaceutyków produkowanych w roślinnych systemach ekspresyjnych, które znajdują się na zaawansowanych etapach badań klinicznych zestawiono w **tabeli 2**.

### **NAJNOWSZE DANE O SZCZEPIONKACH I PRZECIWCIAŁACH PRODUKOWANYCH W ROŚLINACH**

Począwszy od szczepionek przeciw wirusowi HBV (Hepatitis B Virus), wścieklicznie, wirusowi HIV (Human Immunodeficiency Virus), toksynie B przecinkowca cholery, wirusom grypy, wirusowi SARS-CoV-1, aż do szczepionek przeciw nowotworom, na przestrzeni ostatnich 30 lat wyprodukowano za pomocą roślin GM jako platform ekspresyjnych, wiele antygenów stanowiących składniki szczepionek kandydujących do badań klinicznych, a nawet komercyjnego użytku [37]. Szczegółowe informacje dotyczące takich badań zestawiono m.in. w pracy przeglądowej Łucka i in. 2015 [39]. Wśród najnowszych biofarmaceutyków pochodzenia roślinnego, których badania kliniczne przyniosły obiecujące wyniki, znajduje się kwadriwalentna szczepionka zawierająca cząsteczki podobne wirusom grypy (ang. QVLPs) produkowana w *N. benthamiana*. Składniki tej

szczepionki oparte są o podtypy wirusa odpowiadające za sezonowe epidemie grypy (Yamagata i Victoria). W trakcie drugiej fazy badań klinicznych szczepionki QVLP przeciw wirusom grypy przeprowadzono dwa randomizowane badania w grupach osób od 18 do 49 roku życia (identyfikator badania: NCT02233816) oraz od 50 roku życia (identyfikator badania: NCT02236052), których wyniki pozwoliły ustalić dawki szczepionki niezbędne do wytworzenia u badanych odpowiedzi odpornościowej humoralnej i komórkowej. W 2019 roku szczepionka ta została zakwalifikowana do trzeciego etapu badań klinicznych [56, 82, 83].

Podobnie jak w przypadku antygenów, jest wiele przykładów przeciwciał wyprodukowanych w roślinnych systemach ekspresji [67]. Tytoń (*N. tabacum*) był pierwszym organizmem roślinnym wybranym do ekspresji rekombinowanego kompletnego monoklonalnego przeciwciała anty-mysiego IgG<sub>1</sub>(6D4) o właściwościach katalitycznych [26]. Od tego czasu, w roślinnych systemach ekspresyjnych wyprodukowano wiele różnych typów przeciwciał i ich fragmentów, między innymi: jednołańcuchowe fragmenty zmienne (scFv), fragmenty Fab, IgG, chimeryczne przeciwciała wydzielnicze typu IgA (sIgA) czy przeciwciała jednodomenowe (sdAb) [50]. Ponadto w ostatnich latach kilka obiecujących biofarmaceutyków opartych o przeciwciała, produkowane w roślinach, wkroczyło w fazę badań klinicznych. Przykładem takich biofarmaceutyków jest chimeryczne przeciwciało sIgA-G o nazwie *CaroRx*<sup>TM</sup>, skierowane przeciw bakterii *Streptococcus mutans*, powodującej próchnicę zębów czy też *Avicidin*, preparat zawierający przeciwciała klasy IgG skierowane przeciw białku EpCAM zaprojektowany w celu leczenia raka jelita grubego [40]. Badania nad tymi produktami zatrzymały się na etapie II fazy badań klinicznych. *CaroRx*<sup>TM</sup> po obiecujących wynikach badań został wprowadzony na terenie Unii Europejskiej nie jako lek, lecz jako wyrób medyczny, natomiast *Avicidin* pomimo potwierdzonych efektów antynowotworowych został wycofany z badań ze względu na poważne skutki uboczne (niezwiązane z roślinnym pochodzeniem leku) [40, 37].

Wśród obecnie najlepiej rokujących przeciwciał produkowanych przez roślinne systemy ekspresji należy wymienić przeciwciała monoklonalne P2G12, ekspresjonowane w *N. benthamiana* skierowane przeciw wirusowi HIV-1, które w 2015 roku przeszły pomyślnie pierwszą fazę badań klinicznych [41]. Planowane są również dalsze badania mające na celu ustalenie optymalnego dawkowania przeciwciał P2G12 (identyfikator badania: NCT02923999) [85]. Innym przykładem jest lek ZMapp, czyli koktajl składający się z trzech przeciwciał skierowanych przeciwko powierzchniowej glikoproteinie wirusa Ebola produkowany w *N. benthamiana*, którego 1 i 2 faza badań klinicznych zakończyła się w 2019 roku (identyfikator badania: NCT02363322) wraz z rozpoczęciem fazy 2/3 (identyfikator badania: NCT03719586) [84, 86].

**TABELA 2** Przykłady biofarmaceutyków pochodzenia roślinnego znajdujących się na etapie badań klinicznych lub wprowadzonych na rynek. Na podstawie [37] oraz [38]

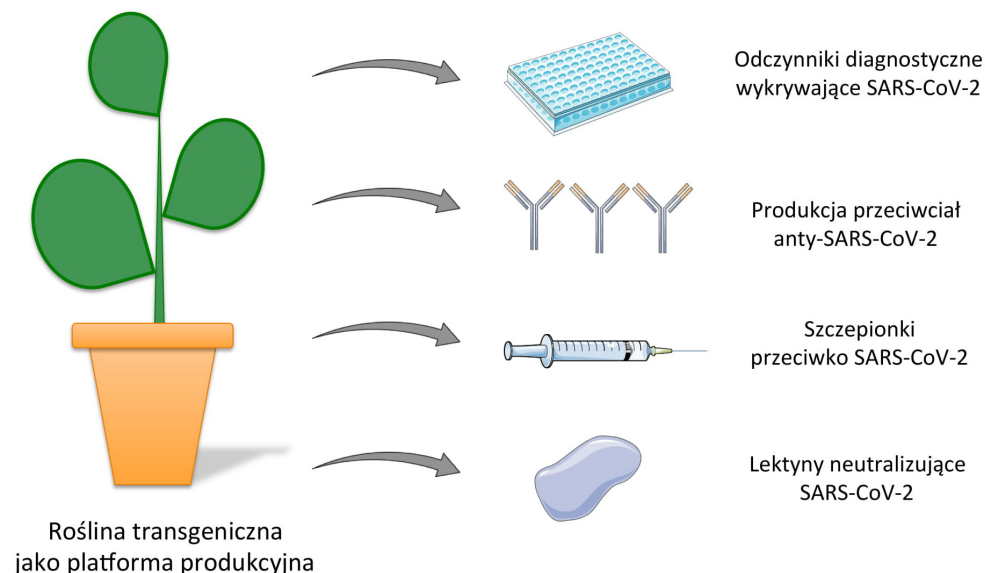
**TABLE 2** Examples of plant-derived biopharmaceuticals at various stages of clinical development. Table is based on [37] and [38]

Produkt białkowy	Zastosowanie	Roślinny system ekspresji	Status badań klinicznych
<b>Szczepionki</b>			
Podjednostka PA83 toksyny <i>Bacillus anthracis</i>	Szczepionka podjednostkowa przeciw wąglikowi	<i>N. benthamiana</i>	Faza 1
eVLP składające się z czterech antygenów wirusa grypy: H1/Cal, H3/Vic, B/Bris, B/Mass	Kwadriwalentna szczepionka przeciw wirusom grypy: H1N1, H3N2 oraz wirusowi grypy typu B (linie: Yamagata i Victoria)	<i>N. benthamiana</i>	Faza 2,3
Idiotypowe scFv pochodzące z nowotworu pacjenta	Indywidualna szczepionka przeciw chłoniakowi nieziarniczemu	<i>N. benthamiana</i>	Faza 1
Podjednostka B toksyny <i>Vibrio cholerae</i>	Szczepionka podjednostkowa przeciw cholercze	<i>O. sativa</i>	Faza 1
Antygen powierzchniowy HBV (HBsAg)	Szczepionka podjednostkowa przeciw HBV	<i>S. tuberosum</i>	Faza 1
Białko S1 wirusa SARS-CoV-1	Szczepionka podjednostkowa przeciw SARS-CoV-1	<i>S. lycopersicum</i> <i>N. tabacum</i>	Przedkliniczne badania na zwierzętach
<b>Przeciwciała</b>			
Koktajl trzech przeciwciał monoklonalnych (13C6, 2G4, 4G7)	Terapia infekcji wywołanej zakażeniem wirusem Ebola	<i>N. benthamiana</i>	Faza 1,2
Przeciwciało monoklonalne P2G12	Terapia infekcji wywołanej wirusem HIV-1	<i>N. tabacum</i>	Faza 1
Przeciwciało monoklonalne CO17-1A	Inhibitor wzrostu raka jelita grubego	<i>N. tabacum</i>	Przedkliniczne badania na zwierzętach
<b>Inne biofarmaceutyki</b>			
Glukocerebrozydaza	Enzymatyczna terapia zastępcza dla pacjentów z chorobą Gaucher'a	<i>D. carota</i>	Zaakceptowany do użytku przez FDA
Laktoferyna	Lek stosowany w przypadku chronicznych stanów zapalnych	<i>O. sativa</i>	Faza 2
Alfa-galaktozydaza A	Enzymatyczna terapia zastępcza dla pacjentów z chorobą Fabry'ego	<i>P. patens</i>	Faza 1

## WYKORZYSTANIE ROŚLINNYCH SYSTEMÓW EKSPRESJI W WALCE Z WIRUSEM SARS-CoV-2

Zastosowanie roślin GM stanowi jeden z kluczowych aspektów badań nad lekami przeciwwirusowymi, przeciwciałami oraz szczepionkami, które są obecnie prowadzone w związku z pandemią wirusa SARS-CoV-2 (**Ryc. 1**), który pojawił się w grudniu 2019 roku w mieście Wuhan w Chinach i szybko rozprzestrzenił się na cały świat [5]. W styczniu 2020 sekwencja genomowa SARS-CoV-2 została udostępniona, dostarczając niezbędnych informacji do opracowania strategii walki z tym wirusem [76].

Lomonosoff oraz Peyret wykorzystują roślinny system ekspresji w badaniach nad uniwersalnym odczynnikiem diagnostycznym mającym na celu udoskonalenie testu na obecność SARS-CoV-2 opartego o reakcje Real Time-PCR. Odczynnik ten ma stanowić kontrolę pozytywną w powyższej reakcji i bazuje na cząsteczkach wirusopodobnych (VLPs), uzyskanych z wirusa mozaiki tytoniu, które zawierają regiony sztucznego genomu wirusa SARS-CoV-2 [5]. Włoska firma biotechnologiczna Diamante stosuje tytoń jako źródło antygenów opartych o domenę



**RYCINA 1** Potencjalne zastosowanie roślin transgenicznych, otrzymanych metodami stałej jak i przejściowej transformacji, w walce z wirusem SARS-CoV-2. Na podstawie [5]. Rycina zawiera obrazy pochodzące z bazy Servier Medical Art. Database (<https://smart.servier.com>) na warunkach licencji Creative Commons Attribution 3.0

**FIGURE 1** Application of transgenic plants obtained by stable as well as transient transformation methods, against SARS-CoV-2 virus. Figure is based on [5] and contains images from Servier Medical Art. Database (<https://smart.servier.com>) and made available under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 license

wiążącą receptor – SARS-CoV-2 (ang. *Receptor Binding Domain*, RBD), używanych w testach ELISA do diagnostyki wykrywania przeciwciał w surowicy krwi. Ponadto rozważa się wykorzystanie roślin do produkcji przeciwciał skierowanych przeciw wirusowi SARS-CoV-2 o wysokiej stabilności i jednocześnie produkcji na szeroką skalę w ciągu zaledwie kilku tygodni. Uzyskanie podobnych efektów w liniach komórek ssaczych zajęłoby najprawdopodobniej miesiące, a poprawa wydajności produkcji nawet lata. Z jednej strony wykorzystanie zrekombinowanych przeciwciał miałyby na celu spowolnienie tempa rozwoju infekcji w organizmie człowieka, co poparte jest niedawnym odkryciem, że surowica pochodząca od ozdrowieńców zmniejsza nasilenie objawów choroby COVID-19 [13]. Z drugiej strony rośliny mogłyby produkować przeciwciała hamujące wysoki poziom cytokin (tzw. burza cytokinowa), który towarzyszy tej infekcji w wielu przypadkach o najcięższym przebiegu. Aktualnie w walce z wirusem SARS-CoV-2 testowane są w badaniach klinicznych dwa przeciwciała skierowane przeciw receptorowi interleukiny 6 (IL-6R), stosowane do tej pory w reumatoidalnym zapaleniu stawów [5].

W walce z wirusem SARS-CoV-2 miałyby być także wykorzystywane lektyny, czyli glikoproteiny występujące u roślin, alg morskich i bakterii. Wiele lektyn hamuje replikację wirusów poprzez interakcję z glikanami w glikoproteinach otoczki wirusowej [5]. Wykazano, że białko GRFT będące lektyną pochodzącą z czerwonych alg rodzaju *Griffithsia*, hamuje namnażanie wirusów, dla których nie ma obecnie skutecznej szczepionki, w tym wirusa HIV [47], Ebola-Zair [2], a także koronawirusa odpowiedzialnego za epidemię SARS-CoV oraz wirusa MERS-CoV [51, 44]. Co istotne, lektyna ta wykazuje niską toksyczność względem komórek ludzkich, a wysoka homologia między białkiem S eksponowanym na powierzchni wirusów SARS-CoV oraz SARS-CoV-2, sugeruje możliwą reakcję krzyżową [5]. Najnowsze doniesienia z października 2020 roku potwierdzają, że GRFT jest w stanie zahamować infekcję SARS-CoV-2 w warunkach *in vitro* [4]. Białko GRFT jak również inne lektyny, były produkowane z wykorzystaniem transgenicznym linii komórek roślin, m.in. *Nicotiana benthamiana* [52]. Taka przejściowa ekspresja w roślinach zapewniłaby szybki dostęp do terapeutyków o działaniu przeciwwirusowym na szeroką skalę [5].

Najwięcej nadziei pokłada się w uzyskaniu skutecznej szczepionki przeciw SARS-CoV-2. Obserwuje się dwa kierunki badań z wykorzystaniem transgenicznym roślin. Pierwszy dotyczy produkcji szczepionki, w której podjednostka białka S1 SARS-CoV-2 ma pełnić rolę antygeny. Firma Kentucky BioProcessing (Owensboro, KT, USA), która jest częścią grupy British American Tobacco, opracowuje tego typu szczepionkę w transgenicznym roślinach tytoniu. Drugi kierunek badań nad szczepionką przeciw SARS-CoV-2 oparty jest o technologię VLP. W przypadku cząsteczek wirusopodobnych nie ma niebezpieczeństwa namnożenia wirusa, gdyż nie zawierają materiału genetycznego, ale jednocześnie indukują



odpowiedź immunologiczną. Gotowa platforma VLP oparta na transgenicznym tytoniu stosowana jest do produkcji szczepionek przeciw grypie H1N1 przez firmę Medicago, która pracuje nad wykorzystaniem tej platformy VLP do produkcji szczepionki na SARS-CoV-2 [5].

## PODSUMOWANIE

Badania związane z rozwojem koncepcji roślin transgenicznych używanych jako bioreaktory do produkcji białek heterologicznych trwają od przeszło trzydziestu lat. Początkowo niski uzysk biofarmaceutyków, żmudny proces oczyszczania białek z materiału roślinnego, a także odmienny szlak glikozylacji białek u roślin spowodowały spadek zainteresowania technologią produkcji w roślinach GM na korzyść innych systemów ekspresyjnych. Obecnie, dzięki opracowaniu i wdrożeniu nowych strategii i rozwiązań, duża część z powyższych trudności została pokonana. Wraz z postępem tych badań wciąż będą pojawiały się nowe pytania dotyczące strategii produkcyjnej, bezpieczeństwa, immunogenności, dawkowania oraz sposobów podawania leków produkowanych w roślinach GM, co będzie wymagało zaangażowania naukowców z wielu różnych dziedzin. Roślinne systemy oparte na przejściowej ekspresji zapewniają możliwości szybkiej produkcji z wykorzystaniem niskich nakładów kapitałowych, co przyciąga zainteresowanie koncernów biotechnologicznych. Możliwość przeniesienia produkcji białek *in vitro* z laboratorium do wielotonowej skali oraz wolność biofarmaceutyków pochodzenia roślinnego od groźnych dla ludzi patogenów jest również pożądaną cechą z finansowego punktu widzenia. Analizując dynamikę oraz kierunek badań, a także potrzeby współczesnego społeczeństwa, można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości biofarmaceutyki produkowane w roślinach transgenicznych stanowiąc będą źródło relatywnie tanich leków oraz szczepionek pozwalających na walkę z wieloma chorobami. Rośliny GM umożliwią także szybką produkcję tanich leków stanowiących odpowiedź na nagle pojawiające się ogniska epidemii, wywołane nowymi szczepami wirusów.

## LITERATURA

- [1] ABIRI R, VALDIANI A, MAZIAH M, SHAHARUDDIN NA, SAHEBI M, YUSOF ZN, ATABAKI N, TALEI D. A Critical Review of the Concept of Transgenic Plants: Insights into Pharmaceutical Biotechnology and Molecular Farming. *Curr Issues Mol Biol* 2016; **18**: 21-42.
- [2] BARTON C, KOUOKAM JC, LASNIK AB, FOREMAN O, CAMBON A, BROCK G, MONTEFIORI DC, VOJDANI F, MCCORMICK AA, O'KEEFE BR, PALMER KE. Activity of and effect of subcutaneous treatment with the broad-spectrum antiviral lectin griffithsin in two laboratory rodent models. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 120-127.

- [3] BENCHABANE M, GOULET C, RIVARD D, FAYE L, GOMORD V, MICHAUD D. Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol J* 2008; **6**: 633-648.
- [4] CAI Y, XU W, GU C, CAI X, QU D, LU L, XIE Y, JIANG S. Griffithsin with A Broad-Spectrum Antiviral Activity by Binding Glycans in Viral Glycoprotein Exhibits Strong Synergistic Effect in Combination with A Pan-Coronavirus Fusion Inhibitor Targeting SARS-CoV-2 Spike S2 Subunit. *Virol Sin* 2020; **14**: 1-4.
- [5] CAPELL T, TWYMAN RM, ARMARIO-NAJERA V, MA JK, SCHILLBERG S, CHRISTOU P. Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends Plant Sci* 2020; **25**: 635-643.
- [6] CASTILHO A, GATTINGER P, GRASS J, JEZ J, PABST M, ALTMANN F, GORFER M, STRASSER R, STEINKELLNER H. N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans. *Glycobiology* 2011; **21**: 813-823.
- [7] CASTILHO A, PABST M, LEONARD R, VEIT C, ALTMANN F, MACH L, GLÖSSL J, STRASSER R, STEINKELLNER H. Construction of a functional CMP-sialic acid biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; **147**: 331-339.
- [8] CHOI SB, WANG C, MUENCH DG, OZAWA K, FRANCESCHI VR, WU Y, OKITA TW. Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature* 2000; **407**: 765-767.
- [9] DANIELL H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J* 2006; **1**: 1071-1079.
- [10] DE MUYNCK B, NAVARRE C, BOUTRY M. Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol J* 2010; **8**: 529-563.
- [11] DECKER EL, RESKI R. The moss bioreactor. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 166-170.
- [12] DOBROWOLSKA A. Wykorzystanie roślin do wytwarzania biofarmaceutyków. *Kosmos* 2004; **53**: 201-206.
- [13] DUAN K, LIU B, LI C, ZHANG H, YU T, QU J, ZHOU M, CHEN L, MENG S, HU Y, PENG C, YUAN M, HUANG J, WANG Z, YU J, GAO X, WANG D, YU X, LI L, ZHANG J, WU X, LI B, XU Y, CHEN W, PENG Y, HU Y, LIN L, LIU X, HUANG S, ZHOU Z, ZHANG L, WANG Y, ZHANG Z, DENG K, XIA Z, GONG Q, ZHANG W, ZHENG X, LIU Y, YANG H, ZHOU D, YU D, HOU J, SHI Z, CHEN S, CHEN Z, ZHANG X, YANG X. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**: 9490-9496.
- [14] FAYE L, BOULAFLOUSA A, BENCHABANE M, GOMORDA V, MICHAUD D. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 2005; **23**: 1770-1778.
- [15] FISCHER R, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P, TWYMAN RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 152-158.
- [16] FLOSS DM, SACK M, ARCALIS E, STADLMANN J, QUENDLER H, RADEMACHER T, STOGER E, SCHELLER J, FISCHER R, CONRAD U. Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnol J* 2009; **7**: 899-913.
- [17] GANAPATHY M. Plants as Bioreactors- A Review. *Adv Tech Biol Med* 2016; **4**: 161.
- [18] GEORGE K, WOOLLETT G. Insulins as Drugs or Biologics in the USA: What Difference Does it Make and Why Does it Matter? *BioDrugs* 2019; **33**: 447-451.
- [19] GLEBA Y, TUSÉ D, GIRITCH A. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; **375**: 155-192.
- [20] GOEDDEL DV, KLEID DG, BOLIVAR F, HEYNEKER HL, YANSURA DG, CREA R, HIROSE T, KRASZEWSKI A, ITAKURA K, RIGGS AD. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 106-110.
- [21] GOMORD V, FAYE L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 171-181.

- [22] GRABOWSKI GA, GOLEMO M, SHAALTIEL Y. Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab* 2014; **112**: 1-8.
- [23] HÄKKINEN ST, RAVEN N, HENQUET M, LAUKKANEN ML, ANDERLEI T, PITKÄNEN JP, TWYMAN RM, BOSCH D, OKSMAN-CALDENTEY KM, SCHILLBERG S, RITALA A. Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnol Bioeng* 2014; **111**: 336-346.
- [24] HANANIA U, ARIEL T, TEKOA H, FUX L, SHEVA M, GUBBAY Y, WEISS M, OZ D, AZULAY Y, TURBOVSKI A, FORSTER Y, SHAALTIEL Y. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant Biotechnol J* 2017; **15**: 1120-1129.
- [25] HE Y, WANG K, YAN N. The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein Cell* 2014; **5**: 658-672.
- [26] HIATT A, CAFFERKEY R, BOWDISH K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 1989; **342**: 76-78.
- [27] HOOD EE, BAILEY MR, BEIFUSS K, MAGALLANES-LUNDBACK M, HORN ME, CALLAWAY E, DREES C, DELANEY DE, CLOUGH R, HOWARD JA. Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnol J* 2003; **1**: 129-140.
- [28] HYUNJONG B, LEE DS, HWANG I. Dual targeting of xylanase to chloroplasts and peroxisomes as a means to increase protein accumulation in plant cells. *J Exp Bot* 2006; **57**: 161-169.
- [29] ITAKURA K, HIROSE T, CREA R, RIGGS AD, HEYNEKER HL, BOLIVAR F, BOYER HW. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 1977; **198**: 1056-1063.
- [30] KALLOLIMATH S, CASTILHO A, STRASSER R, GRÜNWARD-GRUBER C, ALTMANN F, STRUBL S, GALUSKA CE, ZLATINA K, GALUSKA SP, WERNER S, THIESLER H, WERNBURG S, HILDEBRANDT H, GERARDY-SCHAHN R, STEINKELLNER H. Engineering of complex protein sialylation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: 9498-9503.
- [31] KANG T-J, HAN S-C, YANG M-S. Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in tobacco using a herbicide resistance gene as a selection marker. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 2005; **81**: 165-174.
- [32] KOPRIVOVA A, STEMMER C, ALTMANN F, HOFFMANN A, KOPRIVA S, GORR G, RESKI R, DECKER EL. Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnol J* 2004; **2**: 517-523.
- [33] KUMAR GBS, GANAPATHI TR, REVATHI CJ, SRINIVAS L, BAPAT VA. Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Banana Plants. *Planta* 2005; **222**: 484-493.
- [34] KURUP VM, THOMAS J. Edible Vaccines: Promises and Challenges. *Mol Biotechnol* 2020; **62**: 79-90.
- [35] LAU OS, SUN SSM. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnol Adv* 2009; **27**: 1015-1022.
- [36] LI H-Y, RAMALINGAM S, CHYE M-L. Accumulation of Recombinant SARS-CoV Spike Protein in Plant Cytosol and Chloroplasts Indicate Potential for Development of Plant-Derived Oral Vaccines. *Exp Biol Med* 2006; **231**: 1346-1352.
- [37] LOH H-S, GREEN BJ, YUSIBOV V. Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases. *Curr Opin Virol* 2017; **26**: 81-89.
- [38] LOMONOSSOFF GP, D'AOUST MA. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science* 2016; **353**: 1237-1240.
- [39] ŁUCKA M, KOWALCZYK T, SZEMRAJ J, SAKOWICZ T. Rośliny jako alternatywne źródło białek terapeutycznych. *Post Hig Med Dośw* 2015; **69**: 362-373.
- [40] MA JK, DRAKE PM, CHRISTOU P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 2003; **4**: 794-805.

- [41] MA JK, DROSSARD J, LEWIS D, ALTMANN F, BOYLE J, CHRISTOU P, COLE T, DALE P, VAN DOLLEWEERD CJ, ISITT V, KATINGER D, LOBEDAN M, MERTENS H, PAUL MJ, RADEMACHER T, SACK M, HUNDLEBY PA, STIEGLER G, STOGER E, TWYMAN RM, VCELAR B, FISCHER R. Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 2015; **13**: 1106-1120.
- [42] MERCX S, SMARGIASSO N, CHAUMONT F, DE PAUW E, BOUTRY M, NAVARRE C. Inactivation of the  $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the  $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans. *Front Plant Sci* 2011; **8**: 403.
- [43] MICHAUD D, VRAIN TC, GOMORD V, FAYE L. Stability of recombinant proteins in plants. *Methods Biotechnol* 1998; **3**: 177-188.
- [44] MILLET JK, SÉRON K, LABITT RN, DANNEELS A, PALMER KE, WHITTAKER GR, DUBUISSON J, BELOUZARD S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection is inhibited by griffithsin. *Antiviral Res* 2016; **133**: 1-8.
- [45] MISHRA S, YADAV DK, TULI R. Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. *J Biotechnol* 2006; **127**: 95-108.
- [46] MORAVEC T, SCHMIDT MA, HERMAN EM, WOODFORD-THOMAS T. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* 2007; **25**: 1647-1657.
- [47] MORI T, O'KEEFE BR, SOWDER RC 2ND, BRINGANS S, GARDELLA R, BERG S, COCHRAN P, TURPIN JA, BUCKHEIT RW JR, MCMAHON JB, BOYD MR. Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. *J Biol Chem*. 2005; **280**: 9345-9353.
- [48] NOCHI T, TAKAGI H, YUKI Y, YANG L, MASUMURA T, MEJIMA M, NAKANISHI U, MATSUMURA A, UOZUMI A, HIROI T, MORITA S, TANAKA K, TAKAIWA F, KIYONO H. 2007. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10986-10991.
- [49] OAKES JL, BOST KL, PILLER KJ. Stability of a soybean seed-derived vaccine antigen following long-term storage, processing and transport in the absence of a cold chain. *J Sci Food Agric* 2009; **89**: 2191-2199.
- [50] OBEMBE OO, POPOOLA JO, LEELAVATHI S, REDDY SV. Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv* 2011; **29**: 210-222.
- [51] O'KEEFE BR, GIOMARELLI B, BARNARD DL, SHENOY SR, CHAN PK, MCMAHON JB, PALMER KE, BARNETT BW, MEYERHOLZ DK, WOHLFORD-LENANE CL, MCCRAY PB JR. Broad-spectrum in vitro activity and in vivo efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae. *J Virol* 2010; **84**: 2511-2521.
- [52] O'KEEFE BR, VOJDANI F, BUFFA V, SHATTOCK RJ, MONTEFIORI DC, BAKKE J, MIRSALES J, D'ANDREA A-L, HUME SD, BRATCHER B, SAUCEDO CJ, MCMAHON JB, POGUE GP, PALMER KE. Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proc Nat Acad Sci* 2009; **106**: 6099-6104.
- [53] OZAWA K, TAKAIWA F. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of suspension-cultured cell clusters of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 2010; **179**: 333-337.
- [54] PAGNY S, BOUISSONNIE F, SARKAR M, FOLLET-GUEYE ML, DRIOUICH A, SCHACHTER H, FAYE L, GOMORD V. Structural requirements for Arabidopsis beta1,2-xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *Plant J* 2003; **33**: 189-203.
- [55] PEYRET H, LOMONOSSOFF GP. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Mol Biol* 2013; **83**: 51-58.
- [56] PILLET S, COUILLARD J, TRÉPANIÉ S, POULIN JF, YASSINE-DIAB B, GUY B, WARD BJ, LANDRY N. Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza

- vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and  $\geq 50$  years old adults. *PLoS One* 2019; **14**: e0216533.
- [57] PLASSON C, MICHEL R, LIENARD D, SAINT-JORE-DUPAS C, SOURROUILLE C, DE MARCH GG, GOMORD V. Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells. *Methods Mol Biol* 2009; **483**: 145-161.
- [58] POGREBNIYAK N, GOLOVKIN M, ANDRIANOV V, SPITSIN S, SMIRNOV Y, EGOLF R, KOPROWSKI H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 9062-9067.
- [59] ROSALES-MENDOZA S, SORIA-GUERRA RE, MORENO-FIERROS L, ALPUCHE-SOLÍS ÁG, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ L, KORBAN SS. Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague. *Planta* 2010; **232**: 409-416.
- [60] ROZOV SM, PERMYAKOVA NV, DEINEKO EV. Main Strategies of Plant Expression System Glycoengineering for Producing Humanized Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Biochemistry (Moscow)* 2018; **83**: 215-232.
- [61] SAALBACH I, GIERSBERG M, CONRAD UDO. High-level expression of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 529-533.
- [62] SCHILLBERG S, RAVEN N, FISCHER R, TWYMAN RM, SCHIERMEYER A. Molecular Farming of Pharmaceutical Proteins Using Plant Suspension Cell and Tissue Cultures. *Curr Pharm Des* 2013; **19**: 5531-5542.
- [63] SCHILLBERG S, TWYMAN RM, FISCHER R. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Vaccine* 2005; **23**: 1764-1769.
- [64] SCHMIDT JA, MCGRATH JM, HANSON MR, LONG SP, AHNER BA. Field-grown tobacco plants maintain robust growth while accumulating large quantities of a bacterial cellulase in chloroplasts. *Nat. Plants* 2019; **5**: 715-721 (2019).
- [65] SHAALTIEL Y, BARTFELD D, HASHMUELI S, BAUM G, BRILL-ALMON E, GALILI G, DYM O, BOLDIN-ADAMSKY SA, SILMAN I, SUSSMAN JL, FUTERMAN AH, AVIEZER D. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J* 2007; **5**: 579-590.
- [66] SHAALTIEL Y, GINGIS-VELITSKI S, TZABAN S, FIKS N, TEKOA H Y, AVIEZER D. Plant-based oral delivery of b-glucocerebrosidase as an enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *Plant Biotechnol J* 2015; **13**: 1033-1040.
- [67] SHANMUGARAJ B, BULAON CJ, PHOOLCHAROEN W. Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production. *Plants* 2020; **9**: 842.
- [68] STELTER S, PAUL MJ, TEH AY, GRANDITS M, ALTMANN F, VANIER J, BARDOR M, CASTILHO A, ALLEN RL, MA JK. Engineering the interactions between a plant-produced HIV antibody and human Fc receptors. *Plant Biotechnol J* 2020; **18**: 402-414.
- [69] STRETFIELD SJ, LANE JR, BROOKS CA, BARKER DK, POAGE ML, MAYOR JM, LAMPHEAR BJ, DREES CF, JILKA JM, HOOD EE, HOWARD JA. Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* 2003; **21**: 812-815.
- [70] STROTBEK C, KRINNINGER S, FRANK W. The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *Int J Dev Biol* 2013; **57**: 553-564.
- [71] TREMBLAY R, WANG D, JEVNIKAR AM, MA S. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol Adv* 2010; **28**: 214-221.
- [72] VITALE A, PEDRAZZINI E. Recombinant pharmaceuticals from plants: the plant endomembrane system as bioreactor. *Mol Interv* 2005; **5**: 216-225.
- [73] WASĄG P, LENARTOWSKI R. Macierz jądrowa – struktura, funkcja i patogenez. *Postępy Hig Med Dośw* 2016; **70**: 1206-1219.
- [74] WDOVIKOWSKA A. Charakterystyka sekwencji promotorowych w genach roślinnych i rola czynników transkrypcyjnych w odpowiedzi na stres abiotyczny i biotyczny. *Post Biol Kom* 2018; **45**: 247-264.

- [75] WILSON SA, ROBERTS SC. Recent Advances Towards Development and Commercialization of Plant Cell Culture Processes for the Synthesis of Biomolecules. *Plant Biotechnol J* 2012; **10**: 249-268.
- [76] WU F, ZHAO S, YU B, CHEN YM, WANG W, SONG ZG, HU Y, TAO ZW, TIAN JH, PEI YY, YUAN ML, ZHANG YL, DAI FH, LIU Y, WANG QM, ZHENG JJ, XU L, HOLMES EC, ZHANG YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; **579**: 265-269.
- [77] WU J, YU L, LI L, HU J, ZHOU J, ZHOU X. Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnol J* 2007; **5**: 570-578.
- [78] XU J, GE X, DOLAN MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension culture. *Biotechnol Adv* 2011; **29**: 278-299.
- [79] XU J, ZHANG N. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect. *Pharm Bioprocess* 2014; **2**: 499-518.
- [80] ZHONG G-Y, PETERSON D, DELANEY DE, BAILEY M, WITCHER DR, REGISTER III JC, BOND D, LI C-P, MARSHALL L, KULISEK E, RITLAND D, MEYER T, HOOD EE, HOWARD JA. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol Breed* 1999; **5**: 345-356.
- [81] ZWIERZINA H, BERGMANN L, FIEBIG H, AAMDAL S, SCHÖFFSKI P, WITTHOHN K, LENTZEN H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: a potential anticancer drug. *Eur J Cancer* 2011; **47**: 1450-1457.
- [82] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02233816> (dane z dnia 15.01.2020)
- [83] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02236052> (dane z dnia 15.01.2020)
- [84] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02363322> (dane z dnia 15.01.2020)
- [85] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02923999> (dane z dnia 15.01.2020)
- [86] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03719586> (dane z dnia 15.01.2020)

*Redaktor prowadzący – Michał Nowicki*

*Otrzymano: 17.01.2021*

*Przyjęto: 11.02.2021*

*Anna Wdowikowska*

*Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin*

*Uniwersytet Wrocławski*

*ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław*

*e-mail: [anna.wdowikowska@uwr.edu.pl](mailto:anna.wdowikowska@uwr.edu.pl)*

*tel.: 071 3754112*

*fax: 071 3754118*