

Biotechnologia roślin w produkcji biofarmaceutyków



Śląski
Uniwersytet
Medyczny
w Katowicach

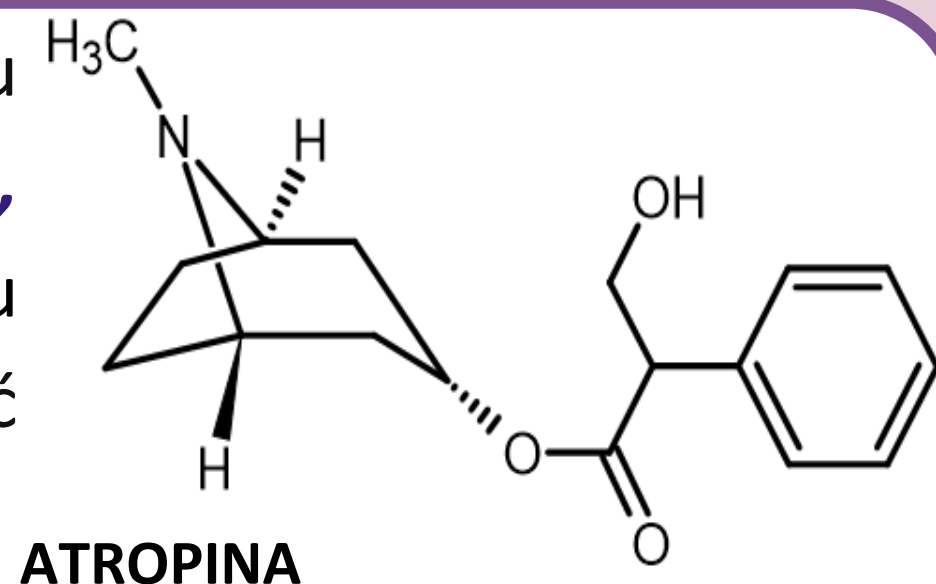
Wiktorija Pacuła^{1*}, Julia Wilk¹, Iga Kordeusz¹, Sabina Gałka²

¹Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej,

²Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

Biofarmaceutyki roślinne to substancje biologicznie czynne pozyskiwane z genetycznie modyfikowanych roślin lub produkowane są przy pomocy technik biotechnologicznych. Zaletą roślin, jako bioreaktorów do produkcji białek terapeutycznych, jest szybki przyrost biomasy oraz akumulacji białek przy obniżonych kosztach produkcji (głównie na etapie oczyszczania finalnego produktu), brak ryzyka przenoszenia chorób odzwierzęcych lub wywołanych mikroorganizmami, obróbka potranslacyjna białka typowa dla komórek eukariotycznych oraz możliwość zastosowania różnych skali, układów, np. hodowla *in vitro*, kultury zawiesinowe, korzeniowe. Do tej pory wykazano użyteczność zastosowania biotechnologii roślin w produkcji wielu farmaceutyków, głównie przeciwciał monoklonalnych, antygenów szczepionkowych, alkaloidów, np. **atropiny**, czy cytokin, m.in. **interferonu alfa** [1].

Atropina pozyskiwana jest z Pokrzyki wilcza jagoda (Ryc.1) - *Atropa belladonna*, która jest rośliną o dużym znaczeniu farmakologicznym ze względu na zawartość alkaloidów tropanowych [2].



Atropina blokuje receptory muskarynowe, które są miejscem działania acetylocholiny. Prowadzi to do szeregu efektów, takich jak: przyspieszenie akcji serca, rozkurcz mięśni gładkich, czy rozszerzenie źrenic [3]. Pomimo swojej toksyczności stosuje się ją jako lek przeciwocholinergiczny, w leczeniu bradykardii i chorób wrzodowych żołądka i jelit, jako substancja rozszerzająca źrenice w diagnostyce okulistycznej i jako antidotum na zatrucia związkami fosforoorganicznymi [2].



Ryc.1. Pokrzyka wilcza jagoda [2]

W warunkach naturalnych alkaloidy te są syntetyzowane głównie w korzeniach pokrzyki, a następnie transportowane do innych jej części. W celu zwiększenia wydajności

produkcji tych cennych związków, prowadzi się hodowlę roślin w warunkach ***in vitro***, w postaci **kultur zawiesinowych** (Ryc.2) [2].

KULTURY ZAWIESINOWE *IN VITRO*

Polegają na hodowli pojedynczych komórek lub małych agregatów komórkowych w płynnej pożywce.

Umożliwia to szybki wzrost i podział komórek, co prowadzi do efektywnej produkcji metabolitów wtórnych. W kulturach zawiesinowych komórki są stale mieszane, co zapewnia równomierne napowietrzenie i dostęp do składników odżywczych [2].



Ryc. 2. Kultury zawiesin komórek roślinnych [2].

Wnioski

- Hodowla *in vitro* roślin leczniczych umożliwia zwiększenie wydajności produkcji związków farmakologicznie czynnych, np. atropiny.
- Transformacja genetyczna roślin umożliwia wydajną produkcję rekombinowanych białek, np. interferonu o dużej aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej.
- Metody biotechnologii roślin stanowią innowacyjny etap w rozwoju terapii, pozyskiwaniu i komercjalizacji leków.

Interferon α jest białkiem o właściwościach przeciwwirusowych i immunomodulacyjnych, stosowany jest w leczeniu m.in. wirusowego zapalenia wątroby typu B i C. IFN- α 2b zajmuje trzecie miejsce, zaraz za insuliną i erytropoetyną, pod względem wykorzystania na światowym rynku biofarmaceutyków [4].

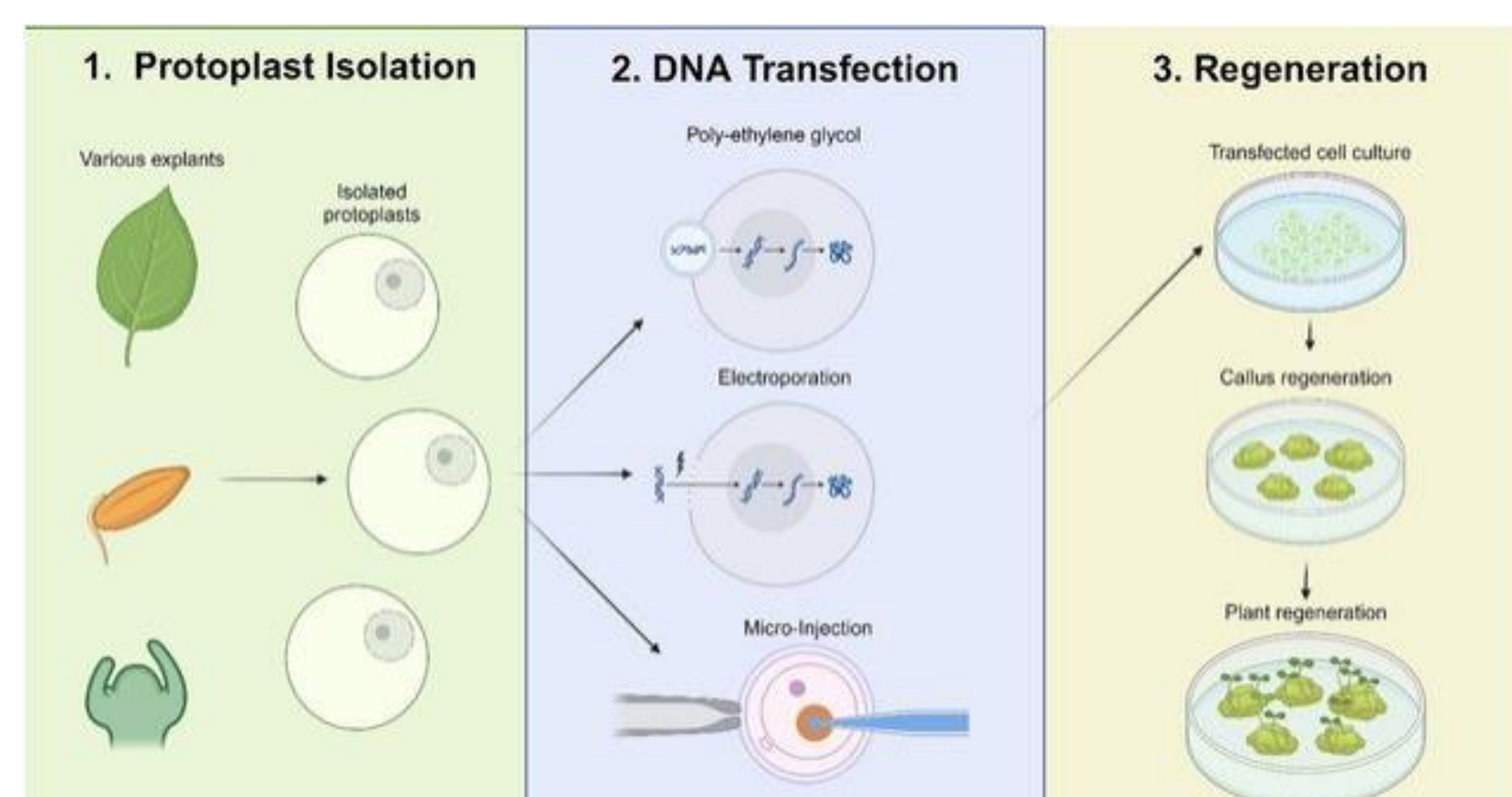
TRANSFORMACJA GENETYCZNA

U roślin sekwencję transgeny można wprowadzić do genomu jądrowego ale o wiele wydajniejszą ekspresję białka rekombinowanego można uzyskać poprzez transformację protoplastów (Ryc.3) lub chloroplastów (których w komórce może być kilkadziesiąt)

Dzięki tej metodzie uzyskano wysoką ekspresję transgenicznego interferonu α 2b (cpIFN- α 2b) w chloroplastach tytoniu i wykazano jego hamujące działanie na replikację wirusa VSV (wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej). Dodatkowo w badaniach z wirusem HIV cpIFN- α 2b skutecznie chronił komórki TZM-BL (pochodne komórek HeLa) przed zakażeniem wariantami HIV BaL i IIB, przewyższając aktywność komercyjnie dostępnego IFN (PEG-Intron).

Przeciwnowotworowe działanie transgenicznego interferonu potwierdzono również *in vivo* u myszy, u których zaobserwowano zwiększenie ekspresji MHC I (główny układ zgodności tkankowej klasy I) na splenocytach i liczby komórek NK (naturalni zabójcy). Dodatkowo myszy leczone cpIFN- α 2b wykazywały znacznie mniej przerzutów czerniaka w płucach.

Powyższe wyniki, wskazujące na wysoką ekspresję cpIFN- α 2b w tytoniu, podobny poziom jego aktywności w porównaniu do komercyjnego preparatu, przekonały badaczy do zainicjowania pierwszej uprawy polowej białka krwi człowieka pochodzącego z transgenicznej rośliny, co stanowi kluczowy krok do dalszych badań klinicznych na ludziach i w komercjalizacji transgenicznego interferonu [4].



Ryc.3. Etapy transformacji protoplastu:

- Izolacja protoplastów z: liści, nasion lub wierzchołków wzrostu.
- Transfekcja z użyciem polioksyetylenoglikolu (PEG), elektroporacji lub mikroiniekcji.
- Regeneracja poprzez stadium kalusa i uzyskanie transgenicznych pędów [6].

Literatura:

- [1] M. Łucka, T. Kowalczyk, J. Szemraj, i T. Sakowicz, „Plants as an alternative source of therapeutic proteins”, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, t. 69, s. 362–373, mar. 2015, doi: 10.5604/17322693.1145824.
- [2] A. Bach i S. Malepszy, Red., *Biotechnologia roślin*, Wyd. 2 zm. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009.
- [3] K. McLendon i C. V. Preuss, „Atropine”, w *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Dostęp: 3 listopad 2024. [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470551/>
- [4] Y. Sindarowska i M. Kuchuk, „Construction of viral-based expression vectors for high-level production of human interferon alpha 2b in plants”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 108, nr 1, s. 229, luty 2024, doi: 10.1007/s00253-024-13069-7.
- [5] P. A. Arlen *i in.*, „Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b”, *Plant Biotechnol. J.*, t. 5, nr 4, s. 511–525, lip. 2007, doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00258.x.
- [6] Hannah LevegoodYun ZhouCankui Zhang, „Advancements in plant transformation: from traditional methods to cutting-edge techniques and emerging model species”, October 2024Plant Cell Reports 43(11) DOI: 10.1007/s00299-024-03359-9