

Genetyczne modyfikacje roślin dla medycyny.

I. Bioreaktory szczepionek

Genetic modifications of plants for medicine. I. Vaccines in modified plants

ZENON STĘPLEWSKI^{1,2/}, ZYGMUNT STĘPLEWSKI^{2/}, KATARZYNA STĘPLEWSKA^{3/}

^{1/} Department of Cancer Biology and Biotechnology Foundation Laboratories, Thomas Jefferson University

^{2/} Wyższa Szkoła Umiejętności im. Stanisława Staszica w Kielcach

^{3/} Katedra i Zakład Patomorfologii Wydziału Lekarsko-Dentystycznego w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Przedstawiamy przegląd wyników aktualnych badań istniejące dziedzinie genetycznie modyfikowanych roślin do produkcji szczepionek. Szczepionki otrzymywane poprzez użycie genetycznie zmodyfikowanych roślin mają przewagę nad klasycznie produkowanymi szczepionkami. Należy tu zaliczyć bezpieczeństwo (rośliny nie mają prionów czy rakotwórczych wirusów), niskie koszty produkcji oraz globalny dostęp do takich szczepionek. Szczepionki izolowane z roślin transgenicznych mogą być kierowane przeciw antygenom wirusów, bakterii i komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe: szczepionki z roślin, wścieklizna, wąglik, szczepionki przeciwrakowe

The review of the present research in the field of genetically modified plants is presented. Plant derived vaccines have advantages over other methods of vaccine production. These include safety (plants have no prions or cancerogenic viruses), low costs and global availability. Plant derived vaccines may be derived against immunogenic antigens of viruses, bacteria and cancer cells.

Key words: plant derived vaccines, rabies, anthrax, cancer vaccines

© *Probl Hig Epidemiol* 2008, 89(1): 1-3

www.phie.pl

Nadesłano: 27.02.2008

Zakwalifikowano do druku: 27.03.2008

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. zw. dr hab. n. med. Zygmunt Stęplewski
Holendry 24, 26-015 Pierzchnica

Dotychczas istniejące metody produkcji szczepionek wymagają dużych nakładów finansowych. Do odległych miejsc w krajach trzeciego świata szczepionki nie zawsze docierają, a ich skuteczność nie zawsze jest zachowana z braku sprzętu i z braku pełnej wiedzy. Mimo to, ospa i *polio* zostały wyeliminowane właśnie dzięki klasycznym szczepionkom. Nowe choroby zakaźne – takie, jak: AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) czy SARS (*severe acute respiratory syndrome*) – są obecnie na warsztatach wielu ośrodków – jak dotychczas bez wyraźnych efektów.

Ostatnio ogromny wstrząs przeżyło środowisko naukowe wiele sobie obiecujące po nowej szczepionce przeciw HIV proponowanej przez znaną firmę farmaceutyczną Merck. Szczepionka składa się ze zmodyfikowanego adenowirusa zawierającego trzy geny wirusa HIV. Celem była aktywacja przeciwwirusowej aktywności komórek T (*T killer cells*). Pierwsza analiza 1500 uczestników prób klinicznych (połowa otrzymała szczepionkę a połowa otrzymała placebo) nie wykazało żadnej różnicy w ilości nowych zaka-

żeń (uczestnikami tych prób byli mężczyźni homoseksualni). Wszystkie poszukiwania szczepionki przeciw wirusowi HIV znalazły się znowu w punkcie bliskim początku [1].

Pozostaje również problem dotarcia do odległych, zacofanych miejsc z klasycznymi oraz nowymi szczepionkami, jak również problemy ekonomiczne, takie jak stale rosnące koszty produkcji wynikające nie tylko z inflacji, ale również z coraz większych wymagań FDA (*Federal Drug Administration*) i innych organów kontrolnych. Stare, klasyczne szczepionki użyte do eliminacji *polio* czy ospy nie uzyskałyby dziś zgody żadnego z tych organów. Nawet kraje wysoce rozwinięte muszą się liczyć z kosztami produkcji.

Dla przykładu – zapobieganie przenoszeniu wścieklizny mogłoby uratować tysiące ludzi w rozwijających się krajach poprzez eliminację źródeł zakażenia takich, jak niebezpieczne psy lub dzikie zwierzęta (szopy, lisy, nietoperze, itp). W porównaniu z wydatkami na kontrole wścieklizny poprzez immunizację potencjalnych nosicieli zwierzęcych

w krajach rozwiniętych, budżety krajów rozwijających się nie są w stanie im sprostać.

Tego typu prewencyjne szczepienia kosztują kraje zachodnie około 230 milionów a nawet bilion dolarów rocznie [2]. Z wyliczeń wynika że zabezpieczenie od wścieklizny jednego ludzkiego życia kosztuje od 10 tysięcy do 100 milionów dolarów [3].

Istnieje zatem potrzeba taniej, bezpiecznej, nowoczesnej metody produkcji nowych szczepionek na bazie *genomics* i *proteomics*.

Rośliny transgeniczne zostały obecnie podniesione do rangi takich nowoczesnych bioreaktorów produkujących tanie, bezpieczne i wysoce aktywne szczepionki [4].

Najnowsze technologie skutecznie wprowadzają do genomu roślin geny zwierzęce, wirusowe i bakteryjne. Wysoką ekspresję tych genów uzyskuje się poprzez zakażenie roślin zmodyfikowanym wirusem choroby mozaikowej tytoniu TMV (*tobacco mosaic virus*) albo *alfalfa mosaic virus* (AMV). Taka przejściowa ekspresja obcych genów daje jednorazowo bardzo dużą ilość nowego białka [4]. Wprowadzenie nowych genów do roślin za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* prowadzi do stabilnej, trwałej transformacji roślin w wysoce wydajne bioreaktory nowych, biologicznie czynnych białek [5] w następnych generacjach genetycznie zmodyfikowanych roślin. Nowe białka mogą być izolowane z wyciągów z liści, kwiatów, nasion lub całych roślin.

Izolacja oraz oczyszczanie antygenowych białek jest łatwa, wysoce wydajna, a koszty dziesięcio- a nawet stokrotnie niższe. Technologia ekspresji dobrze scharakteryzowanych, immunogennych białek jako szczepionek jest obecnie bardzo zaawansowana i możliwa na dużą skalę.

Dotychczas taką ekspresję antygenów białkowych (polipeptydowych) uzyskano dla powierzchniowego antygeny wirusa *hepatitis B* [6,12], termolabilnej enterotoksyny *E. coli* [7], glikoproteiny wirusa wścieklizny [8,11], białka kapsydowego wirusa *Norwalk* [9] oraz ludzkiego RSV (*respiratory syncytial virus*) [13].

W laboratoriach *Biotechnology Foundation* w Filadelfii w ostatnich kilku latach genetycznie zmodyfikowane rośliny zostały użyte do produkcji serii nowoczesnych szczepionek.

Wścieklizna

Chimeryczny wektor zawierający antygenowe determinanty wirusa wścieklizny – amplifikowane białko G (aminokwasy 253-275) oraz nukleoproteina N (aminokwasy 408-418) został sklonowany w białko otoczki *alfalfa mosaic virus* (AIMV). Taki klon białka otoczki (CP) AIMV został wprowadzony do rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum*) albo szpinaku.

Myszy immunizowane doustnie takim rekombinowanym wirusem roślinnym stały się odporne na infekcje dzikim wirusem wścieklizny. U ludzkich ochotników, uprzednio szczepionych przeciw wirusowi wścieklizny, spożycie zielonego szpinaku zakażonego rekombinowanym wirusem AIMV, znaleziono znamienne wzrost poziomu przeciwciał anty-wirusowych [14].

SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrom*)

SARS-coronavirus (CoV) *spike protein* (białko S) jest jednym z kandydatów na skuteczną szczepionkę anty-wirusową. N-terminal – fragment tego białka S (S1) – wprowadzono do genomu roślin pomidorów. Z wyselekcjonowanych linii transgenicznego pomidora izolowany antygen indukował systemową i śluzówkową odpowiedź immunologiczną u myszy. W surowicy myszy wykazano wysokie miano CoV specyficznych immunoglobulin A (IgA) po doustnym podaniu transgenicznych pomidorów, a w surowicy myszy po parenteralnym podaniu transgenicznego antygeny wykazano obecność immunoglobuliny G (IgG) specyficznej dla białka S1 [15].

Wąglik (*Anthrax*)

Alfalfa Mosaic Virus (AIMV) został użyty dla ekspresji 15-aminokwasowego epitopu 4-domeny antygeny (PA-D4s) bakterii wąglika *Bacillus anthracis*. Ten rekombinant wirusa AIMV z łatwością był produkowany przez zakażone rośliny tytoniu. Izolowany wirus indukował u myszy mocną odpowiedź immunologiczną. Surowice immunizowanych myszy zawierały przeciwciała rozpoznające zarówno natywne antygen PA jak i AIMV CP [16].

Nowotwory

Olbrzymi postęp w leczeniu nowotworów pozwala na „wyleczenie” wcześniej rozpoznanych nowotworów klasycznymi metodami chirurgicznymi, radioterapią i chemioterapią. Ale w grupie pacjentów wysokiego ryzyka około połowie grozi nawrót choroby po około 5 latach [17].

Nawrót choroby nowotworowej jest zwykle znacznie trudniejszy do leczenia i często jest oporny na terapie.

Zapobieganie nawrotom choroby nowotworowej staje się zatem zasadniczym problemem nowoczesnej onkologii. Aktywna i pasywna immunoterapia nowotworów staje się nowym narzędziem onkologii. Szczepionki przeciwnowotworowe mają więc szansę na wywołanie odpowiedzi immunologicznej przeciwrakowej.

Pojedyncze, rozsiane komórki nowotworowe są zwykle niewykrywalne i często niewrażliwe na terapię adjuwantową. Metody immunoterapeutyczne są skuteczne w takich przypadkach tym bardziej, że

eliminacja komórek raka jest możliwa bez względu na ich status mitotyczny.

Kilka dobrze scharakteryzowanych TAA's (*Tumor Associated Antigens*) mają szansę stać się nowoczesnymi szczepionkami przeciwrakowymi. Jednym z nich jest EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), antygen wykryty przez monoklonalne przeciwciała CO17-1A i noszący nazwę GA72-2. Antygen ten został sklonowany przez Szale [20] i doskonale scharakteryzowany [18-21]. Ekspresja tego antygeny w roślinach okazała się dość łatwa [22]. Izolowany antygen EpCAM jest wysoce immunogenny i wywołuje odpowiedź immunologiczną – tak humoralną jak i komórkową. Ostatnie doświadczenia wykazały, że antygen indukuje immunoglobuliny, które

są zdolne do lizy komórek nowotworowych i zapobiega wzrostowi nowotworów ludzkich w nagich myszach nu/nu [23].

Chcielibyśmy tutaj podkreślić, że rośliny transgeniczne są doskonałym, tanim, bardzo bezpiecznym bioreaktorem do produkcji biologicznie czynnych białek i szczepionek. Mimo insynuacji prasy i słabo uświadomionych działaczy, że takie rośliny niosą jakieś niebezpieczeństwa dla ekosystemu lub społeczeństwa – nikt do dziś nie przedstawił naukowych dowodów w poważnych naukowych czasopismach, że taka sytuacja powstała. A sytuacja jest zupełnie odwrotna i dobrodziejstwa niesione przez transgeny są oczywiste.

Piśmiennictwo / References

- Cohen J. Promising AIDS Vaccines Fairly Leaves Field Reeling. *Science* 2007; 9, 318: 28-29.
- Maslin F-X, Fishbein DB, Matter HC. Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries [in:] Rupprecht CE, Dietzschold B and Koprowski H (eds.): *Lyssaviruse*. Springer-Verlag, Berlin 1994: 1-26.
- Fishbein DB, Robinson LE. Rabies. *N Eng J Med* 1993; 329: 1632-1638.
- Yusibov V, Koprowski H. Plants as vectors for biomedical products. *J Med Food* 1998; 1: 5-12.
- Koprowski H, Yusibov V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 2001; 19: 2735-2741.
- Mason HS, Lam DM-K, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11745-11749.
- Haq TA, Mason H, Clement JD, Arntzen CJ. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 1995; 268: 714-716.
- McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michael FH. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Bio/Technology* 1995; 13: 1484-1487.
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5335-5340.
- Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses against rabies and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5784-5788.
- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu FZ, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V. Immunization against rabies with plant derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2481-2485.
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisova O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki A. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 1999; 13: 1796-1799.
- Belanger H, Fleysh N, Cox S, Bartman G, Deka D, Trudel M, Koprowski H, Yusibov V. Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J* 2000; 14: 2323-2328.
- Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikhcheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002; 20: 3155-3164.
- Pogrebnyak 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 USA* 2005; 102: 9062-9067.
- Brodzik R, Bandurska B, Deka D, Golovkin M, Koprowski H. Advances in alfalfa mosaic virus-mediated expression of anthrax antigen in planta. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 338: 717-722.
- Gothinger H, Funke I, Johnson JP, Gokel JM, Riethmuller G. The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: Its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1986; 38: 47-53.
- Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal cancer carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Som Cell Genet* 1979; 5: 957-971.
- Steplewski Z. Monoclonal antibodies to human tumor antigens. *Transplant Proc* 1980; 12: 384-387.
- Szala S, Froelich M, Scollon M, Kasai Y, Steplewski Z, Koprowski H, Linnenbach A. Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA73-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3542-3546.
- Chong M, Speicher DW. Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA73-2 (CO17-1A, EGP, KSI-4, KSA and EpCAM). *J Biol Chem* 2001; 276: 5804-5813.
- Verch T, Hooper DC, Kiyatkin A, Steplewski Z, Koprowski H. Immunization with plant-produced colorectal cancer antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 92-99.
- Brodzik R, Spitsin S, Golovkin M, Bandurska B, Portocarrero C, Okulicz M, Steplewski Z, Koprowski H. Plant derived EpCAM antigen generates protective anti-cancer response. *Nature Biotechnology* – submitted 2007.